

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Mario Stanić, apsolvant

Diplomski studiji Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

MIKROPROPAGACIJA I AKLIMATIZACIJA MASLINE (*Olea europaea* L.)

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Mario Stanić, apsolvant

Diplomski studiji Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Voćarstvo

MIKROPROPAGACIJA I AKLIMATIZACIJA MASLINE (*Olea europaea* L.)

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Brigita Popović, predsjednik
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. doc.dr.sc. Dejan Agić, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
2.PREGLED LITERATURE.....	2
2.1. Povijest uzgoja i masline.....	2
2.2. Botanička klasifikacija.....	3
2.3. Morfologija masline.....	4
2.3.1. Koriijen.....	4
2.3.2. Deblo.....	5
2.3.3. Grančice.....	6
2.3.4. List.....	6
2.3.5. Cvijet.....	7
2.3.6. Plod.....	9
2.4. Ekologija masline.....	10
2.5. Proizvodnja masline u Hrvatskoj.....	13
2.6. Razmnožavanje masline.....	14
2.6.1. Generativno razmnožavanje.....	14
2.6.2. Vegetativno razmnožavanje.....	15
2.6.3. Dosadašnja istraživanja i tehnika razmnožavanja masline in vitro.....	18
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva.....	23
3.2. Biljni materijal – sortiment u pokusu.....	24
3.2.1. Leccino.....	24
3.2.2. Pendolino.....	24

3.2.3. <i>Frantoio</i>	25
3.2.4. <i>Coratina</i>	26
3.3. Uvođenje maslina u kulturu i stvaranje aseptičnih uvjeta.....	26
3.4. Hranjivi mediji.....	28
3.5. Tretmani u pokusu.....	29
3.6. Mjerenja u istraživanju.....	30
3.7. Obrada dobivenih podataka.....	31
4. REZULTATI.....	32
4.1. Rezultati na razini cijelog pokusa.....	32
4.2. Rezultati između kultivara u odgovoru na primjenjene tretmane.....	33
4.3. Rezultati unutar primijenjenih tretmana za pojedine kultivare.....	35
5. RASPRAVA.....	38
6. ZAKLJUČAK.....	44
7. POPIS LITERATURE.....	46
8. SAŽETAK.....	50
9. SUMMARY.....	51
10. POPIS TABLICA.....	52
11. POPIS SLIKA.....	53
12. POPIS GRAFIKONA.....	55
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	56
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	57

1. UVOD

Maslina je jedna od najvažnijih voćnih vrsta na području Mediterana. Posljednjih godina zabilježen je trend povećanja površina pod intenzivnim nasadima masline u cijelom svijetu. Potrebe za kvalitetnim sadnim materijalom dugi niz godina predstavljaju glavnu kako proizvođača tako i rasadničara u našoj zemlji. Postoje razne metode razmnožavanja maslina, ali njihova krajnja kvaliteta i čistoća je često upitna. Za većinu sorti masline mikropropagacija predstavlja vrlo brz i masivan način razmnožavanja. Prva izvješća o razmnožavanju maslina metodom mikropropagacije datiraju od sredine 1970-ih. Sam model mikropropagacije uključuje niz faza i operacija koje zahtijevaju visok stupanj čistoće (sterilni uvjeti) i znanja u manipulaciji s biljnim materijalom (obučenost radnika). Pod pojmom mikropropagacija podrazumijeva se proizvodnja i dobivanje bezvirusnog, zdravog sadnog materijala, visoke kvalitete i neupitne čistoće. Osim navedenog, jedna od glavnih prednosti mikropropagacije je dobivanje uniformnih biljaka.

Jedan od glavnih uvjeta uspješne stope razmnožavanja je svakako hranjivi mediji. Najprikladniji mediji za razmnožavanje smatraju se OM mediji, MS mediji i njegove modifikacije, iako je dokazano da su djelotvorni i neki drugi manje korišteni mediji. Pored same formulacije mikro i makro elemenata (medij), vitamina, također i hormoni (regulatori rasta) su vrlo važni u samom procesu. Jedan od vrlo važnih hormona u *in vitro* proizvodnji masline je citokinin zeatin. S vremenom je otkriveno nekoliko jeftinijih alternativa zeatinu poput tidiazuron, BAP, kokosove vode, itd, ali još uvijek zeatin rezultira najidealnijim rezultatima. Također jedan od bitnih čimbenika svakako je i izvor energije (šećer), a u praksi se danas najviše upotrebljavaju manitol i saharoza. Njihov učinak i djelotvornost prvenstveno ovise o koncentraciji. Osim pravilnog odabira medija, hormona i izvora energije o uspješnost razmnožavanja ovisi i izbor eksplantata, njegovoj starosti, načinu uzorkovanja, vremenu uzorkovanja i uvjetima pod kojim je rastao te uvjetima u finalnoj fazi aklimatizacije.

Cilj ovog istraživanja je ispitati mogućnost poboljšanja uvođenja masline u kulturu tkiva modifikacijom hranjive podloge, odnosno uporabom različitih formulacija hormona ali i ispitati mogućnost ukorjenjavanja i klimatizacije masline transferom eksplantata na supstrat (*ex vitro*).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Povijest uzgoja i masline

Maslina (*Olea europaea* L.), pripada rodu *Olea*, porodici *Oleaceae*, jedna je od najstarijih pripitomljenih voćnih vrsta starog svijeta (Zohary A i Spiegel-Roy P, 1975.). Tradicionalno se uzgaja na Mediteranu, a zemlje koje graniče s morem obuhvaćaju 95% maslinika, s proizvodnjom od oko 97% maslinovog ulja i 75% stolne masline. Prvi znakovi uzgoja maslina u istočnom Mediteranu, pokrivaju područje istočne Turske, zapadnog Irana, Libanona, sjevernog Izraela, Sirije i sjevernog Iraka i datiraju iz vremena 4. tisućljeća pr. Kr. (Zohary A i Spiegel-Roy P, 1975., Loukas M i Krimbas CB, 1983., Zohary D i Hopf M, 1994.).). Od tad se kreće prema zapadu, Grčka i Egejski arhipelag, iako vjerojatno i Kreta i Cipar pripadaju najstarijem centru maslinarstva. Početkom prvog tisućljeća pr. Kr širenje maslina nastavilo se prema zapadu, na Siciliju i Tunis. Rimljani su prenijeli masline na mnoga druga mjesta na Mediteranu, uključujući Španjolsku, Francusku i sjevernu Afriku. S padom rimskog carstva, drastično se smanjio uzgoj maslina, ona je ponovno dobila na važnosti tijekom 17. stoljeća. Proizvodnja maslina proširila se na kultivirana područja SAD-a, Kine, Južne Afrike, Japana, Novog Zelanda, Indije i Pakistana (Fabbri A i sur., 2004., Fabbri A i sur., 2009.).

Zahvaljujući osvješćenju potrošača na području Zapadne Europe, SAD-a, Japana, razvija se tržište maslinova ulja i to posebno zbog njegovog hranidbenog učinka i činjenice da se radi o zdravoj mediteranskoj hrani. Iz analize podataka iz 2003. godine, može se vidjeti da je najveći proizvođači bila Španjolska sa 6,160,100 tona sa površinom od 2,400,000 ha, slijede je Italija, Grčka, Turska, Sirija, Tunis, Maroko, Egipat, Alžir, Portugal i Libanon.

Hrvatsko maslinarstvo je uistinu u uzlaznoj putanji i posljednjih desetak godina doživljava pravu renesansu. U 2016. godini u Hrvatskoj je proizvedeno 31, 187 tona maslina, oko 35000 hektolitara maslinovog ulja. Površine pod maslinicima iznosile su oko 18,184 ha, za 1000 ha manje nego godinu ranije, razlog su ljetni požari i zapušteni maslinici. Prema zadnjim podacima Arkoda u Republici Hrvatskoj bilježi se oko 3.750.000 stabala masline, u prosjeku 217 stabala po hektaru. Prosječan urod iznosi 2 tone po hektaru, uzevši u obzir broj stabala dolazi se do podataka da prosječan urod po stablu u RH iznosi 9kg, uz prosječan randman, dobije se jedna litra ulja po stablu na temelju obrađenih podataka HAPIH-a.

Brijunska maslina smatra se najstarijom na Mediteranu (Slika 1.), utvrđeno je karbonskom analizom uzorka iz korijenovog vrata, utvrđena je starost preko 1600 godina. Maslina redovno daje rod, te je sastavni dio jedinstvenog krajolika Brijuna i svojom bujnom i bogatom krošnjom te impresivnom širinom debla daje jedinstvenu vizuru ovoj mikrolokaciji.



Slika 1. Brijunska maslina (Izvor: Internet¹)

2.2. Botanička klasifikacija

Maslina zauzima mjestu u sistematici biljaka:

- Odjeljak: *Magnoliophyta* (*Angiospermae*, skrivenosjemenice)
- Klasa: *Magnoliatae* (*Dicotyledones*, dikotile)
- Podklasa: *Asteridae*
- Nadred: *Laminae* (*Tubiflorae*)
- Red: *Oleales* Linley 1833 (masline)
- Familija: *Oleaceae* Hoffmannseff et Link 1805 (masline)
- Rod: *Olea* L. (maslina)
- Vrsta: *Olea europaea* L. (maslina)

Podvrste:

- *Olea europaea oleaster* L.
- *Olea europaea sativa* L. (pitoma maslina) (S. Lavee, 1996.)

2.3. Morfologija masline

Maslina je zimzelena biljka. Visina biljke ovisi o pedoklimatskim uvjetima, uvjetima uzgoja i sortimentu. Postoji razlika između samoniklih ili divljih maslina (*Olea Europea Eleaster*), i pitomih ili uzgojenih (*Olea Europaea Sativa*). Divlja maslina ima sitan plod i listove, na granama se mogu pronaći bodlje u nekim slučajevima. U visinu može narasti od 3 do 15 m. Karakterizira je dug životni vijek, često preko 100 godina, a poznati su slučajevi gdje su stabla maslina doživjela i tisuće godina.

Zahvaljujući regeneraciji pomoću zametanja pupova u zoni korijenovog vrata, stvara se specifičan korijenov sustav koji produžava život masline. Staro deblo zamjenjuje se novim izdancima i sam ciklus se ponavlja u stresnim slučajevima ili odumiranja stabla. Također karakteristično je formiranje tvorevina koje se nazivaju guke, različitih oblika i dimenzija, formiraju se po cijelom deblu.

2.3.1. Korijen

Korijen masline razvija se dublje ili pliće, ovisno o tome da li je stablo uzgojeno iz sjemena ili izdanaka, o sastavu tla, o razmaku između stabala i uvjetima uzgoja. Ukoliko je stablo uzgojeno iz sjemena, prodire žilom provodnicom vrlo duboko u zemlju i prodire, te se širi koliko i krošnja. Prednost uzgoja iz sjemena je ta što takve biljke razvijaju jak korijenov sistem koji odolijeva jakim vjetrovima i bolje podnosi sušu. Biljke koje se razmnožavaju vegetativnim putem, razvijaju višesmjerni korijenov sustav, dok biljke sa slabijim korijenovim sustavom formiraju kržljivo stablo koje se teško razvija. U početku, mladi korijen je bijele boje, sadrže dlačice karakteristične za dikotiledone. Odrvenjivanjem korijena boja postaje sve tamnija. U suvremenim maslinicima, gdje je navodnjavanje neophodno, glavnina korijena se razvija na dubini do 100cm (Slika 2.). Glavni korijen je direktno povezan s jednom od grana, što omogućava interakciju svakog korijena s po jednom specifičnom sekcijom krošnje (Miranović, 2006.).



Slika 2. Koriijen masline (Izvor: Internet²)

2.3.2. *Deblo*

Deblo masline u većini slučajeva nije visoko, te se krošnja počinje granati na visini od 2 m, rijetko od 3 ili više od 3 m iznad tla (Slika 3.). Deblo dostiže debljinu do 1 m u promjeru, a ponekad može biti i više. Obično u starim maslinicima se može vidjeti da stara debla odumiru, a zamjenjuju ih mladi izdanci. Panjevi su obično stari dok su stabla više puta pomlađena. Drvo masline je prilično tvrdo, ali je krhko, te je jako cjenjeno u industriji.



Slika 3. Deblo masline (Izvor: Internet³)

2.3.3. Grančice

Mladice se razvijaju iz latentnih pupova, lateralnih ili guka. Mladice su vrlo bujne, obično su to vodopije (Slika 4.), a može ih biti više ili manje, ovisno o sortimentu i pomotehnike. Jednogodišnje grančice donose rod, mogu biti samo rodne, vegetativne ili mješovite. Rodne i mješovite grančice su fleksibilne i obično su dužine 10-40cm



Slika 4. Grančica masline (Izvor: Internet⁴)

2.3.4. List

Listovi su suprotni i ovalni, sjede na kratkim peteljkaama te su na rubovima uvijeni (Slika 5.). Listovi se šire kroz tri mjeseca, tijekom proljeća i zamjenjuju se nakon dvogodišnjeg životnog razdoblja; drugi jaz rasta pojavljuje se u jesen (*Dimantoglou i Mitrakos, 1981.*). Lišće je zimzeleno, gusto i kožnato (*Denninger i sur., 1993.*). Lice lista je svijetlozelene boje, a naličje je bijelo, grana uvijek završava sa jednim listom. U pazušcima listova se nalaze pupovi, mogu biti šiljasti ili okrugli. Okrugli su cvjetni a šiljasti drveni. Stome se nalaze samo na donjoj strani lista, odnosno naličju. Njihova sposobnost podvrgavanja dehidraciji ograničena je visokom internom difuzijskom otpornošću, što je posljedica gustog „pakiranja“ mezofilnih stanica (*Giono i sur., 1999.*). Stome ograničavaju gubitak vode i čine maslinu relativno otpornom na sušu. Na površini lista prisutne su i višestanične dlačice (*Martin, 1996.*). Slojevi štitastih vlakana na vanjskoj površini listova vjerojatno

zahvaćaju topli i vlažni zrak ispod otvora za puči te time smanjuju gubitak vode iz biljke (Fahn, 1986.). Starije lišće od 3 godine uvijek je prisutno na stablu, dok listovi starosti 1-3 godine obično otpadaju u proljeće.



Slika 5. List masline (Izvor: Internet⁵)

Osnovne karakteristike lista

1. Oblik
2. Veličina
3. Debljina
4. Površina lista
5. Nervatura
6. Stome

Dimenzija i oblik lista su bitni zbog produkcije organskih tvari, transpiracije, otpornosti prema ekološkim uvjetima i parazitima. Listovi su indikatori problema koji se pojavljuju prilikom stresa, ishrane i nepovoljnih uvjeta. Prvi simptomi se ogledaju u promjeni boji samog lista, distorziji i nekrozama.

2.3.5. Cvijet

Cvjetovi masline su mali, bijele boje, grupirani u klasterima od 10-30, razvijaju se u pazušcu lista u rano proljeće na starim stabljikama od dvije godine. Većina sorti maslina je samooplodna. Boja cvjetova u početnim fazama je zelene boje, a klorofil se gubi iz latica

pred otvaranje cvjetova. Ukupan broj cvjetova na cvatima, njihov raspored i dužina su genetski određeni i zbog toga su specifični za svaku sortu. Cvijet ima četiri zelena čašična listića, četiri bijele latice u osnovu spojene i zajedno opadaju na kraju cvjetanja, dva prašnika, a plodnica je smještena u centru čašice. Boja cvjetova je u fazi razvoja zelene boje (Slika 6.).

Broj cvjetova i sama dimenzija variraju iz godine u godinu, te ovise od klimatskih uvjeta i samog stanja biljke. Obično se pupoljak formira tokom trenutne sezone, ali pupoljci mogu ostati „uspavani“ dulje od godinu dana i zatim započeti s rastom, stvarajući cvjetove sezonu kasnije od očekivanog (*Martin, 1996.*).



Slika 6. Cvijet masline (Izvor: Internet⁶)

Glavni preduvjet za uspješnu oplodnju je vjetar, sama oplodnja traje 7-10 dana. Dvije vrste cvjetova susrećemo svake sezone: potpuno funkcionalni cvijet koji sadrži prašnik i tučak; i prašničke cvjetove (funkcionalno muški), koji sadrže abortirani tučak i funkcionalne prašnike. Udio potpunih i funkcionalno muških cvjetova varira s cvatnjom kultivarom i godinom (*Martin, 1996.*). Tučak je zelen kad je nezreo i tamno zelen kada je otvoren, odnosno u punom cvatu. Kod funkcionalno muških cvjetova tučci su sićušni, jedva se dižu iznad baze cvijeta. Tučak je malen, smeđi, zelenkasto-bijeli ili bijeli, a njuška tučka je velika i perasta kao što je to slučaj u potpuno funkcionalnom tučku (*Martin, 1996.*).

2.3.6. Plod

Plod masline je koštunica s kožicom, koja je prekrivena voštano prevlakom nepropusnom za vodu. Meso je bogato mastima pohranjenim tijekom lipogenze od kraja kolovoza do pune zrelosti. Plod je u početku zelen, u punoj zrelosti postaje crn (Slika 7.). plod se sastoji od tučka, a stjenka plodnice ima mesnate i suhe dijelove. Pokožica nema dlačica i sadrži puči, mezkokarp je jestiv. Veličina, oblik, boja ploda i površinska morfologija ovise u najvećoj mjeri od kultivara. Endokarp se povećava do pune veličine i otvrdnjava 6 tjedana nakon pune cvatnje, a mezokarp i egzokarp nastavljaju postepeni rast (*Martin, 1996.*). Koštica se sastoji od omotača koji se ljeti (kraj srpnja) sklerotizira (*Barranco i sur., 1992.*) i sjemenke.



Slika 7. Plod masline (Izvor: Internet⁷)

Prema klasifikaciji oblik ploda određen je odnosom dužine i širine te može biti (*Bottari i Spina, 1952.*):

- Sferičan do sferoidan
- Jajast do cilindričan
- Cilindričan do izdužen

Boja ploda mijenja se dozrijevanjem od početne zelene boje do krajnje tamnije crveno-ljubičaste i crne boje. 75-85% ukupne mase ploda čini meso ploda, a 15-30% je ulje. Endokarp (koštica) čini 13-23% mase ploda, to je drvenasta ljuska u kojoj se nalazi sjemenka (*Bottari i Spina, 1952*).

Prema veličini ploda (Bottari i Spina, 1952.) klasificiraju maslinu na sljedeće kategorije:

- Sitni plodovi (450 do 600 plodova u 1kg)
- Srednje krupni plodovi (300 do 450 plodova u 1kg)
- Krupni plodovi (od 100 do 300 plodova u 1kg)

Oblik koštice (Bottari i Spina, 1952.):

- Izdužen
- Eliptičan
- Jajast

2.4. Ekologija masline

Osnovni preduvjet za uzgoj masline je klima, s obzirom da je maslina dugogodišnja zimzelena biljka, potrebno joj je osigurati odgovarajuće uvjete.

Olea Europaea razvila je niz prilagodljivih mehanizama za preživljavanje pri dugotrajnim ljetnim uvjetima na mediteranskom području, koji utječu na količinu vode i asimilaciju CO₂ (*Moreno i sur., 1996*), (*Gucci i sur., 1997*). Maslina je vrlo izdržljiva i ravnodušna prema tlu. Osjetljiva je na vlagu i jake vjetrove (*Terral, 1997*).

Svjetlost - Maslina je biljka heliofit, iz tih razloga ima velike potrebe za svjetlosti. Svjetlost je bitan faktor u procesu fotosinteze i također je izvor topline. Utječe na razvoj krošnje, na

zametanje i razvoj plodova. Intenzitet svjetlosti varira u odnosu na položaj nasada. O trajanju osvjetljenja ovisi razvoj biljke po stadijima i njezino stupanje u fazu plodonošenja, dok o jačini osvjetljenja ovisi količina organske tvari koja će se stvoriti u lišću. Različite sorte imaju i različite potrebe prema svjetlosti. Najbolji položaji za maslinu su osunčani južni položaji, dok se sjeverni položaji izbjegavaju. U uvalama u blizini planina, šuma, visokih objekata i većim nadmorskim visinama može se javiti nedostatak svjetlosti.

Toplina - je neophodna za život biljke, jedan od čimbenika koji uvjetuju životne procese poput disanja, transpiracije, fotosinteze, zametanja plodova, usvajanje mineralnih tvari iz tla, diferencijacija pupova i sl.

Prema Azzi-u (1941, 1952.), potrebne temperature za pojedine faze biološkog ciklusa masline su sljedeće:

- Resanje i cvjetanje 10°C
- Početak cvjetanja i oplodnje 15°C
- Od zametanja ploda do izmjene boje ploda (šarak) 20°C
- Od promjene boje do potpune zrelosti 15°C
- Završetak zriobe do kraja berbe 5°C
- Od kraja berbe do pojave cvata (resa) 5°C

Srednja godišnja temperatura za uzgoj maslina kreće se oko 15-20°C, apsolutna maksimalna temperatura može biti i preko 42°C bez većih štetnih posljedica za maslinu. Minimalna temperatura niža od -10°C može prouzročiti štete ako zahlađenje traje duže od 10 dana. S obzirom da maslina cvjeta kasnije, rani proljetni mrazovi nisu tako opasni kao za druge voćne vrste.

Voda - maslina je vrlo otporna prema suši. Iako se maslina uzgaja bez navodnjavanja u većini slučajeva, tijekom dugih sušnih razdoblja, maslina isključivo ovisi o zalihama vode u tlu. Kritično razdoblje masline prema vlazi je kolovoz i rujan, u fazi intenzivnog porasta ploda. Od ukupne vode u biljci, maslina za izgradnju tkiva i organa troši 0.1 do 0.4%, a ostalo ispari putem transpiracije. Relativna vlažnost zraka pri uzgoju masline kreće se od 60 do 70%.

Vjetar - u većini slučajeva djeluje negativno na biljku (Slika 8.), iako za maslinu u pojedinim fazama ima pozitivno djelovanje, iz razloga što je maslina anemofilna biljka.

Njegov učinak ovisi od jačine, pravca i stanja biljke u trenutku pojave. Vjetrovi u vrijeme cvatnje i oplodnje su negativni jer isušuju tučak cvijeta, dok lagani vjetrovi sprečavaju gljivična oboljenja. Pri podizanju nasada potrebno je voditi brigu o odabiru terena kod kojih izostaju jaki vjetrovi, odabirom pravca sadnje sjever-jug, može se u velikoj mjeri smanjiti utjecaj vjetrova i osigurati bolja osunčanost.



Slika 8. Štete od vjetra (Izvor: Internet⁸)

Jaki vjetrovi isušuju tlo, pojačavaju transpiraciju, deformira i lomi krošnju, pojačava utjecaj štetnika, otežana zaštita od bolesti i potpomaže eroziju.

Tlo - je jedan od osnovnih čimbenika pri uzgoju maslina, pa se pravilnom izboru treba posvetiti posebna pažnja. Fizikalne i kemijske karakteristike tla odlučuju o vegetativnom i reproduktivnom ciklusu same biljke. Fizikalna svojstva tla najvažnija su za uspješan razvoj biljke, ukoliko ona nisu povoljna, intenzivno voćarenje nije moguće, jer popravak tala loših fizikalnih karakteristika je vrlo skupo i neizvedivo. Dok s druge strane kemijska i biološka svojstva mogu se nadoknaditi odgovarajućim mjerama. Potrebno je naglasiti da maslina može uspijevati na tlima koja nisu pogodna za većinu drugih voćnih kultura. Sam prinos i kvaliteta ovisi o kakvoći tla. Na dubokim i plodnim tlima, maslima ima bujnu vegetaciju i daje visoke prinose. Zaslanjena tla nisu pogodna za uzgoj masline. Za uzgoj masline smatraju se tla koja sadrže 3-5% humusa, 8-15% fosfora i 20-30% kalija. Za

podizanje nasada masline, pogodni tereni su oni s blagim nagibom bez izraženog reljefa, na kojima se lakše izvode radovi. Tereni sa 25% i više nagiba nisu poželjni zbog nemogućnosti primjene mehanizacije. Za utvrđivanje pogodnosti tla za maslinu, potrebno je poznavati i vodo-zračni režim.

Reljef - prilikom podizanja nasada, potrebno je odabrati pogodne položaje za uzgoj masline. Bitni čimbenici su nadmorska visina, nagib, ekspozicija i izvor vode. Sam odabir terena uvelike utječe na vegetaciju, temperaturu, padaline i osunčanost. Položaji s visokim nadmorskim visinama nisu pogodni zbog niskih temperatura i jakih vjetrova. Južni položaji smatraju se najpogodniji zbog visoke sume temperatura i osunčanosti. Sjeverni položaji su manje osvijetljeni, hladniji i vlažniji. Površine trebaju da budu homogene bez depresija, sa blagim nagibom od 3-5°.

2.5. Proizvodnja maslina u Hrvatskoj

Maslina je voćna vrsta koja se uzgaja dugi niz godina na području Republike Hrvatske. Gledano genetski, maslina je veoma stabilna biljna vrsta te je pretpostavka da su doneseni fenotipovi aklimatizirali na naše uzgojno područje i kao takve ih možemo i danas pronaći na terenu (Drezga, 2013.). Ove genotipove mi danas nazivamo autohtonim i udomaćenim sortama masline (Drezga, 2013.).

Prema popisu iz 2003. godine, u Hrvatskoj je zabilježeno i evidentirano oko 2.435.000 stabala i oko 2.100.000 rodni stabala masline. Dok u 2006. godini zabilježena je tendencija rasta broja stabala masline od 3.215.000, od čega rodni 2.800.000 stabla.

Tablica 1. Proizvodnja maslina, dsz.rh (statistički ljetopis, 2016)

	2011.	2012.	2013.	2014.
Površina, ha	17.200	18.100	18.590	19.082
Proizvodnja ukupno, t	31.423	50.945	34.269	8.840
Prirod po ha, t	1.8	2.8	1.8	0.5

Najviše stabala se nalazi na otocima. Otoki na kojima prevladava su: Krk, Cres, Murter, Šolta, Brač, Hvar, Korčula, Lastovo, Zadar te Mljet i njegova okolica (*Ministarstvo povratka i useljništva, 2013.*). Najzastupljenije sorte u Hrvatskoj su talijanska sorta Leccino, a od autohtonih sorti to su Oblica, Drobница, Lastovka, Istarka bjelica itd.

Područje uzgoja masline podijeljeno je na podregije:

- Podregija Istra
- Podregija Kvarner
- Podregija sjeverne Dalmacije
- Podregija srednje Dalmacije
- Podregija južne Dalmacije
- Podregija Dalmatinsko zaleđe

Podregija Srednja Dalmacija smatra se kao područje sa najviše stabala masline, 40% od ukupnog broja stabala u Hrvatskoj, na otoku Braču nalazi se oko milijun stabala.

2.6. Razmnožavanje masline

Maslina se u prirodi razmnožava samostalno. Sa željom uzgoja maslina na određenim površinama i pod određenim uvjetima, čovjek je počeo sa proizvodnjom sadnica iz matičnih stabala. S ciljem poboljšanja karakteristika, nastali su rodniji i kvalitetniji sortimenti.

Razlikuju se dva načina razmnožavanja, razmnožavanje sjemenom i razmnožavanjem vegetativnih dijelova masline.

2.6.1. *Generativno razmnožavanje*

Razmnožavanje sjemenom koristi se jedino kod proizvodnje podloga. S obzirom da je maslina stranooplodna, sorte se ne mogu umnožavati, odnosno ne prenose se identična svojstva sa matičnog stabla na novonastalu biljku. Uglavnom se koristi kod oplemenjivanja maslina, kod stvaranja novih sorti planskim križanjem ili hibridizacijom. Tehnološki proces generativnog razmnožavanja uključuje sjetvu pitome ili divlje masline, cijepljenje i uzgoj okulanta do određene faze. Sam proces je dugotrajan i skup, i u Hrvatskoj se rijetko koristi.

2.6.2. Vegetativno razmnožavanje

Vegetativno razmnožavanje se uglavnom koristi u proizvodnji sadnog materijala masline. Razmnožavanje se obavlja putem spajanja plemke koja prenosi sortne karakteristike i podloge ili mogućnosti regeneracije dijelova biljke. Vegetativnim razmnožavanjem se vjerno prenose osobine, te novo nastale biljke su uniformne. Najstariji način vegetativnog razmnožavanja masline je korijenskim izdancima i izdancima iz debla (*Jacoboni, 1989; Mladar i sur., 2000*).

Načini razmnožavanja masline vegetativnim putem:

- Razmnožavanje gukama
- Razmnožavanje izdancima
- Razmnožavanje zrelim i zelenim reznicama
- Razmnožavanje cijepljenjem
- Razmnožavanje *in vitro*

Razmnožavanje gukama - je prije razvoja metode orošavanja prevladavalo u proizvodnji sadnog materijala masline. Sadni materijal proizveden ovim putem, kasnije ulazi u rod (6-7 godina), a razlog tome je dugi mladenački stadiji. Guke su bogate latentnim pupovima i sadrže rezerve za ishranu poslije odvajanja, daju velik broj izdanaka i korijenja, koje se razvija u narednoj vegetacijskoj godini (Slika 9.). Vrijeme odstranjivanja je period jesen-zima i ukopavaju se na dubinu 20-30cm. Za komercijalnu primjenu razmnožavanja gukama potreban je velik broj matičnih stabala.



Slika 9. Guke masline (Izvor: Internet⁹)

Razmnožavanje izdancima - jedan od najstarijih oblika vegetativnog razmnožavanja. Izdanci se razvijaju iz adventivnih pupova korijena, osobito onih pri površini. Izdanci dobiveni ovim putem ne koriste se kao gotovo sadnice za sadnju. Za uzimanje izdanaka, najpogodnija su stara zapuštena stabla koja imaju izrasle izdanke na panju ili gukama. Ukoliko se izdanak razvio iz zemlje ili vrlo blizu zemlji, te ako su stariji dvije ili više godina, imaju dobro razvijen korijen, te takav izdanak može poslužiti kao buduća sadnica. Prilikom odvajanja izdanka, potrebno je voditi računa da sadnica ima što više korijena, a manje guka. Ukoliko izdanci rastu na panju i nemaju razvijen korijen, nagrtanjem zemlje može se potaknuti stvaranje bočnih žila.

Razmnožavanje reznicama - predstavlja moderniji i rasprostranjeni način proizvodnje sadnica. Ovaj model razmnožavanja omogućava uzimanje veće količine materijala za razmnožavanje po matičnoj biljci (Slika 10.). Primjenom metode „umjetne magle“ u proizvodnji sadnica, danas se brzo dolazi do ukorjenjivanja reznica. Navedenom metodom ukorjenjivanje je povezano s posebnim sustavom koji omogućuje rezniku da sačuva funkcionalnost aktivnosti listova tijekom cijelog procesa. Metoda „umjetne magle“ u svijetu je poznata pod nazivom *Mist propagation* ili nebulizacija, a prvo se počela primjenjivati u SAD-u. Reznice se postavljaju na podloge za ožiljavanje, od internog materijala. Voda se dodaje pomoću mikroorošivača, cilj sustava je da održava povišene

higrometrijske uvjete supstrata i zraka. Za brzo i kvalitetno ožiljavanje maslina potrebna je temperatura supstrata 23-24°C, kao i odgovarajuća količina hormonskih supstanci posebno indol-butanol kiselina (IBA). Potrebno je izbjegavanje stresnih situacija, koje negativno utječu na sam proces ožiljavanja, iz tih razloga, uzgojne površine su prekrivene tunelom od plastike. Nakon što se reznice ukorijene, presađuju se u zemlju da bi kompletirale rast u trajanju 1-3 godine.



Slika 10. Razmnožavanje maslina reznicama (Izvor: Internet¹⁰)

Razmnožavanje cijepljenjem - predstavlja spajanje dva dijela biljke, plemke i podloge (Slika 11.). Dio biljke koji se učvršćuje u zemlju i ima korijen naziva se podloga, a dio koji se kalemi naziva se plemka, sadnica dobivena ovim putem zove se kalem. U prošlosti, razmnožavanje maslina metodom cijepljenja bio je široko rasprostranjen, danas se koristi u slučajevima proizvodnje sadnica koje se teško ukorjenjuju i pri proizvodnji sadnica namijenjenih za otežane uvjete.



Slika 11. Cijepljenje maslina (Izvor: Internet¹¹)

U maslinarstvu kao podloga koristi se divlja maslina (*Olea oleaster*) koja je dio sredozemne makije i pitoma maslina (*Olea europea sativa*) koja se uzgaja u umjerenom klimatskom pojasu. Navrtanje pod koru je najrašireniji način, a obavlja se u periodu kada maslina sadrži najviše soka, čime se postiže veća aktivnost i razmnožavanje meristemskog staničja.

2.6.3. Dosadašnja istraživanja i tehnika razmnožavanja masline *in vitro*

Mikropropagacija je moćan alat za brzu proizvodnju genetskih uniformnih biljaka. *In vitro* kultura može nadvladati neke poteškoće konvencionalnih tehnika razmnožavanja i nudi na neki način genetsko poboljšanje maslina (Rugini 1984, 1995; Rugini i sur. 1995). Biotehnološka metoda kao što je *in vitro* zahtijeva poznavanje tehnika i protokola proliferacije i ukorjenjivanja, posebno kada eksplantati potječu iz zrelih tkiva. Rugini (1984) predložio je specifični mediji za maslinu koji omogućuje vrlo uspješnu uspostavu i regeneraciju *in vitro* kulture kod nekih sorti masline. Opće pravilo *in vitro* kulture ovisi o formulaciji medija (Cozza i sur. 1997). Unatoč opsežnim istraživanjima *in vitro* razmnožavanje maslina i dalje je ograničeno razlog leži u slabijem rastu, slabijem lateralnom rastu, sposobnosti ukorjenjivanja i aklimatizaciji eksplantata. Drugi problem koji se javlja je genotipska varijacija između različitih kultivara, odnosno sortna specifičnost i odgovor (Cozza i sur. 1997).

Mikropropagacija *in vitro* ima niz prednosti, a neke od njih su:

- Razmnožavanje rijetkih, dragocjenih autohtonih sorti ili koje se vrlo teško razmnožavaju drugim metodama
- Masovna proizvodnja sadnog materijala koji je oslobođen od virusa (virus-free)
- Otvaraju se nove mogućnosti oplemenjivanja maslina

Navedena metoda razmnožavanja uvelike se primjenjuje u Italiji, SAD-u i Izraelu, a u posljednje vrijeme i u RH. Razmnožavanje i regeneracija prije svega ovisi o hranjivoj podlozi i kontroliranim sterilnim aseptičnim uvjetima.

Modificirani DKW mediji pokazali su se superiorniji u odnosu na OM ili modificiranu verziju WPM medija. To bi moglo biti djelomično zbog veće razine Ca^{2+} , N^{3-} ili S^{2-} u modificiranom DKW, nego u drugim medijima. Između različitih citokina dodanih u mediji, Z (Zeatin) i TDZ (tidiazuron) dali su bolje rezultate u odnosu na neke druge.

Uključivanjem TDZ-a u mediji pospješeno je izduživanje izboja. To se može pripisati rezistenciji TDZ-a na citokinin oksidaze i njegovu sposobnost da inducira nakupljanje endogenih citokina (Arinaitwe i sur. 2000; Murthy i sur. 1998). Nadalje, to bi mogao biti rezultat više citokininske aktivnosti TDZ-a, čak i pri niskim koncentracijama (Arinaitwe i sur. 2000; Karam i Al-Majathoub 2000), ili prisutnost fenilne grupe u TDZ-u, što može biti uzrok zakrčljalog izboja (Sahoo i Chand 1998). To bi moglo značiti da ugradnja TDZ-a u mediji uglavnom smanjuje duljinu internodija. TDZ je biološki aktivniji od BAP-a i zeatina, i potrebne su niže koncentracije u kulturi tkiva. TDZ je učinkovitiji kod većine s kojima je bio uspoređivan, osobito na drvenastim vrstama. U drugim istraživanjima zeatin se pokazao najučinkovitijim citokininom (Rugini, 1986). Međutim, u svim ovim slučajevima korišten je mladi materijal, a tehnika je bila manje učinkovita. Zeatin je najkorisniji citokinin za razmnožavanje maslina (Rugini 1990; Grigoriadou i sur. 2002), potreban je u visokim koncentracijama i relativno je skup (Rugini i Baldoni 2004). Sintetski regulatori rasta kao što je BAP, TDZ i kinetin, potiču stvaranje kratkih izboja i veliki bazalni kalus kod maslina (Rugini 1990). Zeatin je jedini regulator rasta za povećanje proliferacije aksilarnih pupova i naknadno izduženje (Rugini i Baldoni 2004).

Svi mediji korišteni za mikropropagaciju masline (Rugini, Fedeli, 1990.) sadrže saharozu kao izvor energije, iako saharoza nije uvijek metabolizirani ugljikohidrat koji se koristi u mikropropagaciji masline. U maslini (Bielinski, 1982; Linda, Madora, 1993) manitol je jedan od ugljikohidrata prisutnih u transportu i metabolizmu biljke. Manitol i saharoza su testirani pri različitim koncentracijama (oba na 17, 34 i 68 gl^{-1} , također na 8,5 samo za manitol) za poboljšanje proliferacije sorte Maurino. Najviši porast dobiven je u prisutnosti 34 gl^{-1} manitola ili saharoze. Manitol je bio učinkovitiji od saharoze pri istoj koncentraciji. Rezultati pokazuju da manitol može poboljšati rast izdanaka masline, te zamijeniti saharozu u kulturi tkiva. Produljena izloženost visokoj koncentraciji saharoze izaziva ograničenje u metabolizmu tkiva.

Tehnika mikropropagacije masline podrazumijeva provođenje određenih krucijalnih faza:

- Nulta faza
- Faza inicijacije
- Faza multiplikacije
- Faza elongacije ili rizogeneze
- Faza aklimatizacije

Nulta faza - odnosi se na postupak s početnim materijalom, čuvanje u zdravom fitosanitarnom stanju. O ovoj fazi ovisi uspjeh kasnijih faza. Ako genetska stabilnost tkiva varira i tkivo eksplantata koje se upotrebljava za kulturu će utjecati na varijabilnost. Preporučuju se vršni meristemi, zbog smanjenja mikroorganizama, koji se smatraju izvorom zareze.

Faza inicijacije - je najkritičnija faza tijekom koje eksplantati moraju prevladati problem s gljivičnom i bakterijskom kontaminacijom (CIDES, 1999.), te inicirati proliferaciju pupova za koju auksinsko/citokininska ravnoteža u mediju igra ključnu ulogu (*Zuccherrelli i Zuccherrelli, 2003.*). Najčešće korišteni hranjivi mediji za masline su Murashige i Skoog (1962) i Ruggini olive medij (1984). Ovi mediji često su obogaćeni vitaminima i regulatorima rasta (*Sakunasingh i sur., 2004.*). Kultura maslina *in vitro* zahtijeva fotoperiodizam od 16h s intenzitetom svjetlosti od 4000 lux (*Abousalim i sur., 2004.*). Trajanje faza ovisi o genotipu i vremenu uzorkovanja biljnog materijala (*Techniver, 2007.*)

Faza multiplikacije - glavna svrha multiplikacije je postići razmnožavanje bez gubitka genetske stabilnosti. Tijekom faze multiplikacije broj biljaka se povećava. Postoji više načina umnožavanja, a on prije svega ovisi o biološkim ograničenjima i faktoru umnožavanja potrebnom za dobivanje željenog broja jedinki. Od izduženog izdanaka uzimaju se nodijalni segmenti i uzgajaju se na podlozi za umnožavanje (Slika 12.). Stopa umnožavanja je različita za različite biljne vrste. Upotrijebljeni medij često je identičan prvom, iako su moguće manje razlike u hormonskoj ravnoteži (auksin-citokinin) (*Zuccherrelli i Zuccherrelli, 2003.*). U ovoj fazi u mediju koncentracija citokinina prevladava u odnosu na auksine. To je s fiziološke točke gledišta zbog činjenice da citokinini vrše supresiju apikalne dominacije i potiču rast novih izdanaka/stabljika (*Cevie, 1997.*). Tijekom ove faze koriste se neki od provjerenih medija poput MS, OM, WPM s dodavanjem određenih koncentracija citokininskih hormona poput BAP (6-benzilaminopurin) ili zeatina (*Abousalim i sur., 2004.*). Najprikladniji citokinin za mikropropagaciju masline je Zeatin (*Rugini, 1984; Mencuccini i sur., 1995.; Rokba i sur., 2000.*).

Faza elongacije ili rizogeneze - podrazumijeva izduživanje izdanaka. Uključuje: zaustavljanje stvaranja aksilarnih izdanaka ili početak izduživanja izdanaka. Potrebno je potaknuti i stvaranje korijenja. Izdanci se prenose na podloge za ukorjenjivanje. Ukoliko se

izdanci vrsta lako ukorjenjuju, mogu se izravno prenijeti u supstrat, te preskočiti fazu elongacije. Podloge za indukciju korijena ovise o biljnoj vrsti.

Faza aklimatizacije - aklimatizacija podrazumijeva jačanje biljčica, na taj način se biljke privikavaju na smanjenje relativne atmosferske vlažnosti. Smanjenjem atmosferske vlažnosti, bolje se razvijaju kutikularni voštani slojevi koji sprečavaju transpiraciju. Nakon uklanjanja agara s baze, biljke se prenose u hortikulturni supstrat sastavljen prvenstveno od mješavine komposta i tla (*Techniver, 2007.*) ili smjese vermikulit-perlit s omjerom 3: 1 (*Peixe i sur., 2007.*), a zatim se pokrivaju prozirnom folijom kako bi zadržali oko 100% relativne vlage. Listovi biljaka su tanki i nježni te ne mogu fotosintetizirati, puči su otvorene, a gubitak vode je povećan u početku.



Slika 12. *In vitro* maslina pred fazu druge multiplikacije (Foto: Bošnjak, 2019.)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Cilj istraživanja i opis laboratorija za kulturu tkiva

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost uvođenja masline u kulturu tkiva modifikacijom hranjive podloge određenim vrstama citokinina i ispitati mogućnost aklimatizacije masline transferom eksplantata na supstrat.

Ispitivanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva u sklopu Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, laboratorij za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku.

Katedra se prije svega bavi znanstvenim istraživanjem, razvijanjem i poboljšanjem protokola *in vitro* proizvodnje, razvojem oplemenjivačkog i selekcijskog rada u voćarstvu, te proizvodnjom sadnog materijala. Pored polučvrstih medija, odnosno konvencionalnog sustava koristi se i suvremeni sustav bioreaktora (TIB/TIS sustav = tekući mediji). Istraživanja se provode na malinama, orahu, borovnicama, paulovnji, višnji, trešnji, maslini, itd, ali i na nekim voćnim vegetativnim podlogama.

Laboratoriji posjeduje svu opremu za uspješnu provedbu mikropropagacije (autoklav, miješalica, pH metar, laminarni stol, sterilizator, pincete, teglice, itd), osim toga posjeduje i matični biljni materijal (matičnjak, prijavljen u centru za rasadničarstvo HAPIH). Matičnjak je smješten u zaštićenom prostoru fakulteta, a prostor služi i za aklimatizaciju *in vitro* biljaka. Laboratoriji posjeduje i odvojenu prostoriju s policama u kojoj je moguća regulacija svjetlosti i temperature potrebnih za pojedini biljni materijal koji je u fazi inicijacije, multiplikacije, elongacije ili ukorjenjivanja (Slika 13.).



Slika 13. Klima komora s biljnim materijalom u raznim fazama mikropropagacije – laboratorij za voćarstvo FAZOS (Foto: Bošnjak, 2019.)

3.2. Biljni materijal - sortiment u pokusu

3.2.1. *Leccino*

Leccino potječe iz Toscanne u Italiji i vrlo je raširena po cijelom svijetu zbog osobite prilagodljivosti na različite agroekološke uvjete. U Hrvatskoj se osim u Istri proširila po cijelom priobalju sve do juga. Stablo Leccina je prilično bujno, razgranate krošnje. Dobro podnosi niske temperature i do -10 °C bez većih oštećenja. Plodovi su jajolikog oblika i obično se nalaze po dva ili tri u grozdu (Slika 14.). prosječna težina plodova iznosi 2-3 grama, prosječno se u kilogramu nalazi 400-420 plodova. Sorta je stranooplodna, a dobri oprašivači su joj Pendolino, Frantoio i Maurino.



Slika 14. Plod masline Leccino (Izvor: Internet¹²)

3.2.2. *Pendolino*

Talijanska sorta, rasprostranjena na cijelom području Hrvatske. Razvija bujna stabla. Plod je sitan, prosječne mase 2,5-2,7 grama (Slika 15.), crne boje, sadržaj ulja kreće se oko 22%. Maslina Pendolino razvija lancetast list koji je dug i uzak. Maslina pendolino se uglavnom proizvodi u preradi ulja. Prilagodljiva je na različite edafske uvjete, srednje otporna na niske temperature. Uglavnom se uzgaja kao oprašivač, stranooplodna je, najbolji oprašivači su Maurino, Rossiciola i Leccino.



Slika 15. Plod masline Pendolino (Izvor: Internet¹³)

3.2.3. Frantoio

Frantoio pripada u talijanske sorte, porijeklom je iz Toscanne, rasprostranjena po centralnoj Italiji, a u Istri se uzgaja od 1940. godine. Sorta srednje bujnosti, srednje do kasna sorta, rano dolazi u rod. Posjeduje dobru otpornost prema niskim temperaturama. Plodovi srednje veličine 1.5-2.5 grama, jajolikog oblika (Slika 16.). Sorta je samooplodna, a najbolji oprašivači su Leccino, Pendolino. Cijenjena talijanska sorta zbog izuzetne kvalitete ulja.



Slika 16. Plodovi masline Frantoio (Izvor: Interent¹⁴)

3.2.4. Coratina

Coratina potječe iz Puglie i južne Italije. Stablo Coratine je srednje bujnosti, rano rađa, list je dugačak svijetlo zelen, plod je srednje krupan do krupan 4-5 grama, ovalnog oblika, zbog krupnoće ploda koristi se za konzerviranje (Slika 17.). Sorta je prilagodljiva na različite ekološke uvjete. Sorte može izdržati visoke temperature čak do 50 °C, iz razloga što ima otpornije lišće za 5-10 °C u odnosu na sorte iz sjevernojadranskog područja. Coratina maslina je stranooplodna sorta, najbolji oprašivači su Pendolino, Leccino i Frantoio. Sorta je osjetljiva na niske temperature i višak vode u tlu.



Slika 17. Plodovi masline Coratina (Izvor: Internet¹⁵)

3.3. Uvođenje masline u kulturu i stvaranje aseptičnih uvjeta

Eksplantati su uzimani s matičnih biljaka navedenih kultivara (Leccino, Pendolino, Frantoio, Coratina) i preneseni u laboratorij na daljnje postupke pripreme i uvođenja u kulturu tkiva (Slika 18.).



Slika 18. Kultivari u istraživanju – etikete (certifikati) na matičnim biljkama (Foto: Stanić, 2019.)

Po dolasku u laboratorij i nakon pažljivog uklanjanja listova, grančice su secirane na eksplantate s jednim nodijem veličine oko 2 – 3 cm (Slika 19). Nodijalni segmenti su ispirani pod mlazom vode 5 minuta. U svrhu smanjenja fenolne oksidacije, odnosno posmeđenja baze, eksplantati su uranjani u otopinu askorbinske i citrične kiseline (100 mg/l) u kojoj su proveli 60 minuta. Nakon toga prebačeni su u dvije antimikrobne otopine koje su se sastojale od: fungicida (mankozeb + metalaksil + karabendazin + aluminij fosetil u koncentraciji 5 g/l) i antibiotika (oksitetraciklin 1 mg/l + streptomycin 20 mg/l) gdje su proveli po 20 minuta u svakoj otopini. Neposredno nakon toga prebačeni su na vrlo kratko vrijeme od 1 minute u 70% etanol te konačno sterilizirani s 10%/vv komercijalnog NaOCl (komercijalni naziv - Cekina) u vremenu od 10 minuta uz dodatak par kapi Tween 80. Potom su eksplantati preneseni u laminarnu komoru i ispirani u 3 autoklavirane, odnosno sterilne vode. Nakon toga pristupilo se uvođenju eksplantata u kulturu inicijacijom na hranjivi medij. Inicijacija je obavljena u epruvetama koje su sadržavale po 10 ml hranjive podloge (Slika 19.).



Slika 19. Inicijacija i uvođenje eksplantata masline na hranjivi medij za proliferaciju
(Foto: Stanić, 2019.)

3.4. Hranjivi medij

U istraživanju je korištena polučvrsta hranjiva podloga OM – *Rugini olive medium* (Rugini, 1984) uz dodatak različitih koncentracija hormona. Koncentracije hormona biti će detaljno opisane u daljnjem tekstu pod poglavljem 3.5. tretmani u pokusu. Maslina predstavlja vrlo tešku kulturu po pitanju uspjeha *in vitro* jer zahtjeva vrlo specifičnu formulaciju medija. Ruginijev medij (OM medij) prvenstveno je namijenjen proliferaciji izdanaka masline. Medij ima obogaćen sastav u odnosu na MS medij. Tkivo masline karakterizira visok sadržaj Ca, Mg, S, Cu, i Zn. Najbolji izvor dušika je u kombinaciji NO_3^- i NH_4^+ dopunjen s glutaminom 2.19 mg/l. Bolji izvor ugljika u odnosu na saharozu predstavlja manitol (30 – 36 g/l) (Rugini, 1984; Jacoboni i sur., 1993). Ova hranljiva podloga imala je sljedeći sastav makro, mikro elemenata, vitamina i ostalih supstanci (Tablica 2.):

Tablica 2: Sastav OM hranjive podloge korištene u istraživanju.

Mikro elementi	mg/l	μM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	1.00
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	12.40	200.55
KI	0.83	5.00
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	100.00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	14.30	49.75
Makro elementi	mg/l	μM
CaCl ₂	332.16	2.99
Ca(NO ₃) ₂	416.92	2.54
KCl	500.00	6.71
KH ₂ PO ₄	340.00	2.50
KNO ₃	1100.00	10.88
MgSO ₄	732.60	6.09
NH ₄ NO ₃	412.00	5.15
Vitamini	mg/l	μM
Biotin	0.05	0.20
Folna kiselina	0.50	1.13
Glicin	2.00	26.24
Mioinositol	100.00	554.94
Nikotinska kiselina	5.00	40.62
Piridoksin HCL	0.50	2.43
Tiamin HCL	0.50	1.48
Ostale supstance		
Manitol	30 g/l	
PPM	2 ml/l	
PVP	0.1 g/l	
Agar	6.5 g/l	
pH	5.8	

Vrijednost pH podloge se prije autoklaviranja podesila na 5.8, a navedena podloga sterilizirana je u autoklavu pri temperaturi od 121°C u trajanju od 20 minuta i tlaku od 1.2 bara. Ostali instrumenti i pribor sterilizirani su autoklaviranjem u trajanju od 30 minuta na temperaturi od 121°C i tlaku od 1.2 bara. Radni prostor je tretiran UV lampom u trajanju od 60 minuta dok je radna površina tretirana 95%-im alkoholom.

3.5. Tretmani u pokusu

U ovom istraživanju korištena su tri tretmana, odnosno praćen je učinak uporabe različitih hormona citokinina (T1 - zeatin; T2 - kokosova voda + BAP 6-Benzylaminopurin; i T3 - tidiazuron + BAP 6-Benzylaminopurin) u indukciji proliferacije i daljnje elongacije, odnosno multiplikacije eksplantata masline (Tablica 3).

Tablica 3. Korišteni tretmani u istraživanju

T1 - Zeatin	T2 – Kokosova voda	T3 – Tidiazuron
OM + ostale tvari	OM + ostale tvari	OM + ostale tvari
Zeatin 4 ml/l	BAP 0.5 ml/l + Kokosova voda 50 ml/l	BAP 0.2 ml/l + TDZ 0.2 ml/l
10 eksplantata	10 eksplantata	10 eksplantata
Aklimatizacija/rizogeneza (<i>ex vitro</i>) 4 ppm. IBA		

Svaki tretman uključivao je prethodno opisan sastav mikro i makro elemenata, vitamina i ostalih korištenih supstanci u svrhu dodatne sterilizacije i smanjenja fenolnog posmeđenja (Tablica 3). Jedina razlika između tretmana bila je u izboru i sastavu hormona. Tako je tretman 1 (T1- Zeatin) sadržavao 4 ml/l hormona zeatina, tretman 2 (T2 – kokosova voda) kombinaciju hormona BAP 0.5 ml/l + kokosova voda 50 ml/l (Slika 21.) i tretman 3 (T3 - tidiazuron) 0.2 ml/l hormona 6-Benzylaminopurina i 0.2 ml/l tidiazurona. Treba istaknuti kako je zeatin dodan nakon autoklaviranja preko hidrofilnog PTFE syringe filtera 0.2µm, odnosno kada se autoklavirani medij ohladio na <50°C pošto hormon nije termostabilan i pogodan za autoklaviranje. Svaki tretman uključivao je 10 epruveta (Slika 20.), odnosno 10 eksplantata (ukupno 4 sorte x 10 epruveta x 3 tretmana = cijeli pokus 120 epruveta s eksplantatima).

Nakon uspješne proliferacija, elongacije i multiplikacije pristupilo se aklimatizaciji masline, odnosno izduženi izdanci masline su odvojeni od baze te uronjeni u otopinu

hormona IBA (4 ppm/l) u trajanju od 10 sekundi te preneseni na supstrat (*ex vitro*). Eksplantati, odnosno izdanci u fazi aklimatizacije proveli su 40 dana pod režimom povećane vlage od 90% koja se svakih tjedan dana smanjivala za 10% i režimom temperature od 24°C. Fotoperiodizam u komori tijekom proliferacije ali i aklimatizacije iznosi je 16 sati svjetlo, 8 sati mrak (16/8). Intenzitet svjetlosti iznosio je 3.500 lux-a.



Slika 20. Punjenje epruveta OM medijem
(Foto: Bošnjak 2018.)



Slika 21. Kokosova voda
(Foto: Stanić, 2018.)

3.6. Mjerenja u istraživanju

Nakon 30 dana pristupilo se pregledu, odnosno utvrđivanju uspješnosti proliferacije, štetne kontaminacije i broja neživih eksplantata. Kontaminirani i neživi eksplantati izuzeti su iz daljnjeg istraživanja. Svi ostali živi eksplantati kod kojih je došlo do proliferacije i indukcije izdanaka subkultivirani su na novu hranjivu podlogu identičnog sastava i ostavljeni još 30 dana na elongaciju, odnosno izduživanje. Nakon uspješne elongacije pristupilo se mjerenju morfoloških parametara i multiplikacije. Nakon uspješne faze aklimatizacije također se pristupilo mjerenju morfoloških parametara korijena.

Promatrani parametri:

- Uspješnost proliferacije
- Veličina izdanaka
- Broj izdanaka

- Broj listova
- Multiplikacija
- Broj korijenja
- Dužina korijenja
- Uspješnost aklimatizacije

3.7. Obrada dobivenih podataka

Svi dobiveni podatci analizirani su uobičajenim metodama statističke obrade podataka pomoću SAS Software 9.3, programske podrške (2002.-2010., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Office Excell 2010. Korištene su slijedeće statističke metode: analiza varijance (ANOVA), statistički testovi značajnosti utjecaja primijenjenih tretmana – F test i Fisher's LSD test (*eng.* Least Significant Difference) pri razini vrijednosti od $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati na razini cijelog pokusa

Rezultati na razini cijelog pokusa (Tablica 4.) ukazuju da je kultivar Leccino jedini rezultirao značajno kraćom indukcijom izdanaka (0.35^B) ali i brojem izdanaka (0.26^C) i listova (2.29^C) te multiplikacijom (0.77^C) u odnosu na ostale kultivare. Pendolino, Frantoio i Coratina inducirali su podjednake veličine izdanaka te među njima nema značajne razlike. Pendolino je jedini inicirao znatno veći broj izdanaka (1.47^A) u odnosu na ostale kultivare, dok je broj listova (8.32^A) i multiplikacija (2.98^A) značajno veća u odnosu na kultivar Leccino i Coratina.

Tablica 4. Statističke razlike na razini pokusa unutar kultivara i tretmana te interakcija kultivar x tretman za parametre veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija.

Kultivar	Veličina izdanaka	Br. izdanaka	Br. listova	Multiplikacija
Leccino	0.35^B	0.26^C	2.29^C	0.77^C
Pendolino	1.92^A	1.47^A	8.32^A	2.98^A
Frantoio	1.93^A	1.08^B	7.57^{AB}	2.29^{AB}
Coratina	1.66^A	0.47^C	5.49^B	2.01^B
<i>F-test</i>	8.54	31.42	10.09	8.24
<i>p</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Tretman				
T1 – Zeatin	3.12^A	0.99^A	10.10^A	3.57^A
T2 – Kokos. Voda	0.68^B	0.87^A	4.80^B	1.35^B
T3 – Tidiazuron	0.60^B	0.59^B	2.85^B	1.12^B
<i>F-test</i>	40.96	6.12	26.00	23.82
<i>p</i>	<.0001	0.0030	<.0001	<.0001
Interakcija kultivar x tretman				
<i>F-test</i>	3.30	5.15	2.33	1.35
<i>p</i>	0.0051	0.0001	0.0371	0.2399

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Eksplantati koji su bili pod utjecajem tretman sa zeatinom (T1) bez obzira na kultivar razvili, odnosno inicirali su značajno veće izdanke (3.12^A), veći broj listova (10.10^A) i multiplikaciju (3.57^A) u odnosu na ostale tretmane u istraživanju (Tablica 4.). Jedino je tretman T2 – kokosova voda inicirao značajno veći broj izdanaka (0.87^A) u odnosu na tretman s tidiazuronom (T3). Nije utvrđena značajna razlika između tretmana kokosova voda (T2) i tidiazurona (T3) po pitanju ostalih promatranih parametara veličina izdanaka, broj listova i multiplikacija. Interakcija kultivar x tretman bila je značajna za parametar veličina izdanaka, broj listova i broj izdanaka, dok u multiplikaciji nije zabilježena značajnost (Tablica 4.).

4.2. Rezultati između kultivara u odgovor na primijenjene tretmane

Tretman zeatinom (T1) inicirao je značajno manje izdanke na kultivaru Leccino (0.79), između ostalih kultivara nema značajne razlike u veličini izdanaka. Također kultivar Leccino ispoljio je i značajno manji broj izdanaka (0.33) i multiplikaciju (1.77) u odnosu na kultivare Pendolino i Frantoio. Između kultivara Leccino i Cortatina nema značajne razlike u broju izdanaka, broju listova i multiplikaciji (Tablica 5.).

Tablica 5. Razlike između kultivara (Leccino, Pendolino, Frantoio, Coratina) unutar tretmana zeatinom (T1) na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).

T1 – ZEATIN	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Br. izdanaka</i>	<i>Br. listova</i>	<i>Multiplikacija</i>
<i>Leccino</i>	0.79 ^B	0.33 ^B	4.44 ^B	1.77 ^B
<i>Pendolino</i>	3.76 ^A	1.50 ^A	12.85 ^A	4.48 ^A
<i>Frantoio</i>	4.42 ^A	1.50 ^A	14.12 ^A	4.28 ^A
<i>Coratina</i>	3.50 ^A	0.66 ^B	8.91 ^{AB}	3.75 ^{AB}
<i>F-test</i>	5.78	0.33	4.80	2.42
<i>p</i>	0.0025	<.0001	0.0065	0.0824

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Tretman kokosovom vodom (T2) također je inicirao značajno manje izdanke (0.09), broj izdanaka (0.11), broj listova (1.00) i multiplikaciju (0.11) u odnosu na kultivare Pendolino i Frantoio. Također, broj listova i multiplikacija značajno su manji u odnosu na kultivar Coratina. Nema značajne razlike u promatranim parametrima između kultivara Pendolino i

Frantoio. Također i multiplikacija nije značajna između kultivara Pendolino, Frantoio i Coratina (Tablica 6.).

Tablica 6. Razlike između kultivara (Leccino, Pendolino, Frantoio, Coratina) unutar tretmana kokosovom vodom (T2) na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).

T2 – KOKOS. VODA	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Br. izdanaka</i>	<i>Br. listova</i>	<i>Multiplikacija</i>
<i>Leccino</i>	0.09 ^C	0.11 ^B	1.00 ^B	0.11 ^B
<i>Pendolino</i>	0.81 ^{AB}	1.30 ^A	5.75 ^A	1.80 ^A
<i>Frantoio</i>	1.20 ^A	1.50 ^A	7.15 ^A	2.08 ^A
<i>Coratina</i>	0.64 ^B	0.60 ^B	5.30 ^A	1.40 ^A
<i>F-test</i>	6.73	12.44	5.79	7.45
<i>p</i>	0.0010	<.0001	0.0025	0.0005

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Tretman tidiazuronom (T3) na kultivaru Pendolino rezultirao je značajno većim brojem izdanaka i listova te multiplikacijom u odnosu na sve ostale kultivare. Također veličina izdanaka na kultivaru Pendolino značajno je veća od kultivara Leccino. Nema značajne razlike u veličini izdanaka između kultivara Pendolino, Frantoio i Coratina. Nije zabilježena značajnost i u broju izdanaka i listova te multiplikaciji između kultivara Leccino, Frantoio i Coratina (Tablica 7.).

Tablica 7. Razlike između kultivara (Leccino, Pendolino, Frantoio, Coratina) unutar tretmana tidiazuronom (T3) na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).

T3 - TIDIAZURON	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Br. izdanaka</i>	<i>Br. listova</i>	<i>Multiplikacija</i>
<i>Leccino</i>	0.18 ^B	0.33 ^B	1.44 ^B	0.44 ^B
<i>Pendolino</i>	1.20 ^A	1.60 ^A	6.35 ^A	2.65 ^A
<i>Frantoio</i>	0.19 ^{AB}	0.25 ^B	1.37 ^B	0.50 ^B
<i>Coratina</i>	0.84 ^{AB}	0.16 ^B	2.25 ^B	0.88 ^B
<i>F-test</i>	2.04	24.12	4.44	5.76
<i>p</i>	0.1254	<.0001	0.0093	0.0025

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

4.3. Rezultati unutar primijenjenih tretmana za pojedine kultivare

Kultivar Leccino pri tretmanu T1 zeatinom razvio je značajno veće izdanke (0.79) a samim time i veću multiplikaciju (1.77) u odnosu na tretman s kokosovom vodom (T2). Nema značajne razlike u učinku na promatrane parametre između kokosove vode (T2) i Tidiazurona (T3). Također nije zabilježena značajan razlika između tretmana za ispitivane parametre broj izdanaka i broj listova (Tablica 8.).

Tablica 8. Razlike između tretmana (Zeatin, Kokosova voda, Tidiazuron) za kultivar Leccino na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).

LECCINO	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Br. izdanaka</i>	<i>Br. listova</i>	<i>Multiplikacija</i>
<i>T1 – Zeatin</i>	0.79 ^A	0.33	4.44	1.77 ^A
<i>T2 – Kokos. Voda</i>	0.09 ^B	0.11	1.00	0.11 ^B
<i>T3 – Tidiazuron</i>	0.18 ^{AB}	0.33	1.44	0.44 ^{AB}
<i>F-test</i>	2.92	0.89	1.98	3.22
<i>P</i>	0.0709	0.4221	0.1579	0.0555

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Kultivar Pendolino razvio je pri tretmanu zeatinom (T1) značajno veće izdanke (3.76) s značajno većim brojem listova (12.85) i multiplikacijom (4.48) u odnosu na ostale tretmane (Slika 22.). Nema značajne razlike između kokosove vode (T2) i tidiazurona (T3) u veličini izdanaka, broju listova i multiplikaciji. Također nema značajne razlike između tretmana za parametar broj izdanaka (Tablica 9.).

Tablica 9. Razlike između tretmana (Zeatin, Kokosova voda, Tidiazuron) za kultivar Pendolino na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).

PENDOLINO	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Br. izdanaka</i>	<i>Br. listova</i>	<i>Multiplikacija</i>
<i>T1 – Zeatin</i>	3.76 ^A	1.50	12.85 ^A	4.48 ^A
<i>T2 – Kokos. Voda</i>	0.81 ^B	1.30	5.75 ^B	1.80 ^B
<i>T3 – Tidiazuron</i>	1.20 ^B	1.60	6.35 ^B	2.65 ^B
<i>F-test</i>	14.71	0.48	10.66	7.71
<i>P</i>	<.0001	0.6212	0.0004	0.0022

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$



Slika 22. Pendolino – tretman Zeatin - T1 (Foto: Bošnjak, 2019.)

Kultivar Frantoio pri tretmanu zeatinom (T1) inicirao je značajno veće izdanke (4.42), s većim brojem listova (14.20) i multiplikacijom (4.28) u odnosu na ostale primijenjene tretmane. Tretman zeatinom (T1) i tretman kokosovom vodom (T2) razvili su značajno veći broj izdanaka u odnosu na tretman s tidiazuronom (T3). Tretman tidiazuronom statistički gledano je ispoljio najlošije rezultate po pitanju svih promatranih parametara u istraživanju (Tablica 10.).

Tablica 10. Razlike između tretmana (Zeatin, Kokosova voda, Tidiazuron) za kultivar Frantoio na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).

FRANTOIO	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Br. izdanaka</i>	<i>Br. listova</i>	<i>Multiplikacija</i>
<i>T1 – Zeatin</i>	4.42 ^A	1.50 ^A	14.20 ^A	4.28 ^A
<i>T2 – Kokos. Voda</i>	1.20 ^B	1.50 ^A	7.15 ^B	2.08 ^B
<i>T3 – Tidiazuron</i>	0.19 ^C	0.25 ^B	1.37 ^C	0.50 ^C
<i>F-test</i>	50.11	16.54	47.25	51.00
<i>P</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$

Kultivar Coratina također pokazuje vrlo pozitivan odgovor na tretman zeatinom (T1). Veličina izdanaka (3.50) na zeatinu (T1) značajno je veća u odnosu na ostale tretmane

(Slika 23.). Broj izdanaka (0.66), broj listova (8.91) i multiplikacija (3.75) značajno je veća od tretmana tidiazuronom. Nema razlike između tretmana kokosovom vodom (T2) i tidiazuronom (T3) u veličini zdanaka, broju listova i multiplikaciji. Jedino je značajno više izdanaka (0.60) u odnosu na tidiazuron (T3) inicirao tretman kokosova voda (T2) (Tablica 11.)

Tablica 11. Razlike između tretmana citokininom (Zeatin, Kokosova voda, Tidiazuron) za kultivar Coratina na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).

CORATINA	<i>Veličina izdanaka</i>	<i>Br. izdanaka</i>	<i>Br. listova</i>	<i>Multiplikacija</i>
<i>T1 – Zeatin</i>	3.50 ^A	0.66 ^A	8.91 ^A	3.75 ^A
<i>T2 – Kokos. Voda</i>	0.64 ^B	0.60 ^A	5.30 ^{AB}	1.40 ^{AB}
<i>T3 – Tidiazuron</i>	0.84 ^B	0.16 ^B	2.25 ^B	0.88 ^B
<i>F-test</i>	5.36	3.72	2.44	3.46
<i>P</i>	0.0110	0.0374	0.1062	0.0460

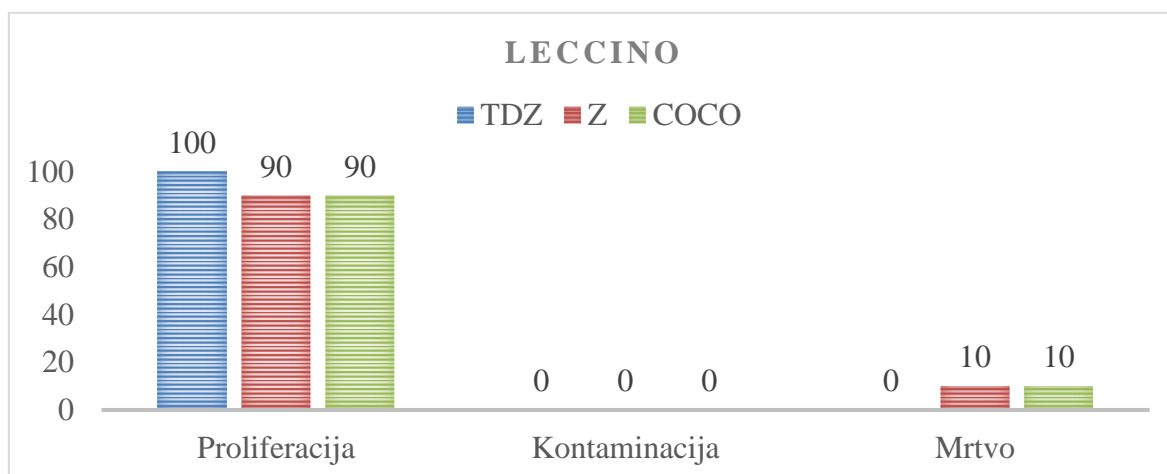
*Vrijednosti iste slovne oznake nisu statistički značajne: ^{AB} razina $p \leq 0.05$



Slika 23. Coratina – tretman Zeatin - T1 (Foto: Bošnjak, 2019.)

5. RASPRAVA

Proliferacija kultivara bila je vrlo uspješna (Grafikon 1.). Dobiveni rezultati ukazuju na uspješnost proliferacije kod kultivara Leccino od 100 % za tiadzuron (T3 – TDZ, Slika 24.) do 90 % za tretmane zeatinom (T1 – Z) i kokosovom vodom (T2 – COCO). Kontaminacija nije zabilježena, a svega je 10 % eksplantata rezultiralo odumiranjem i to na tretmanima s zeatinom (T1 – Z) i kokosovom vodom (T2 –COCO).

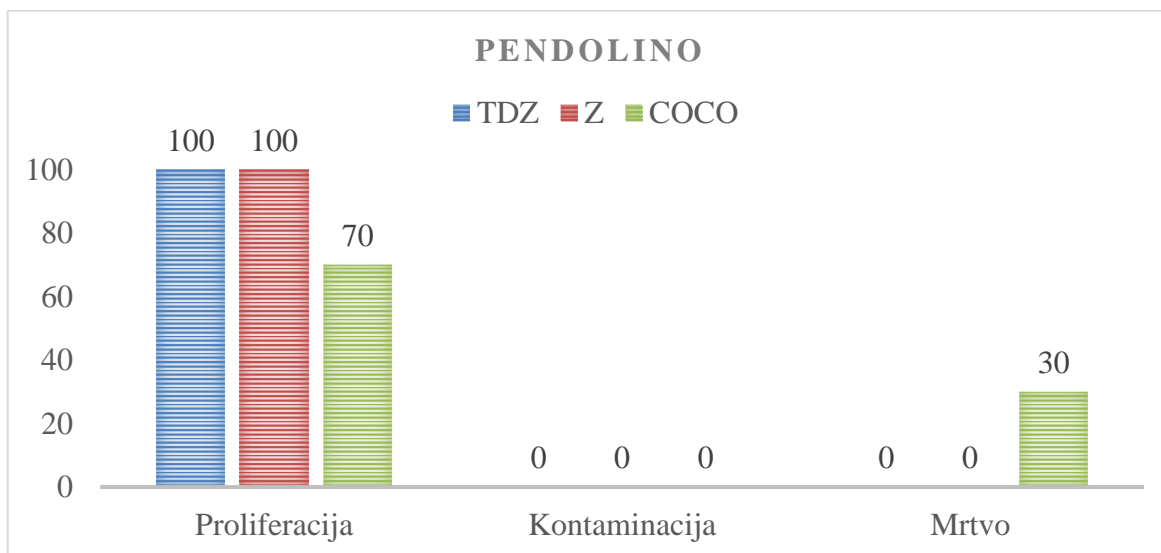


Grafikon 1. Uspješnost proliferacije i sterilizacije na kultivaru Leccino

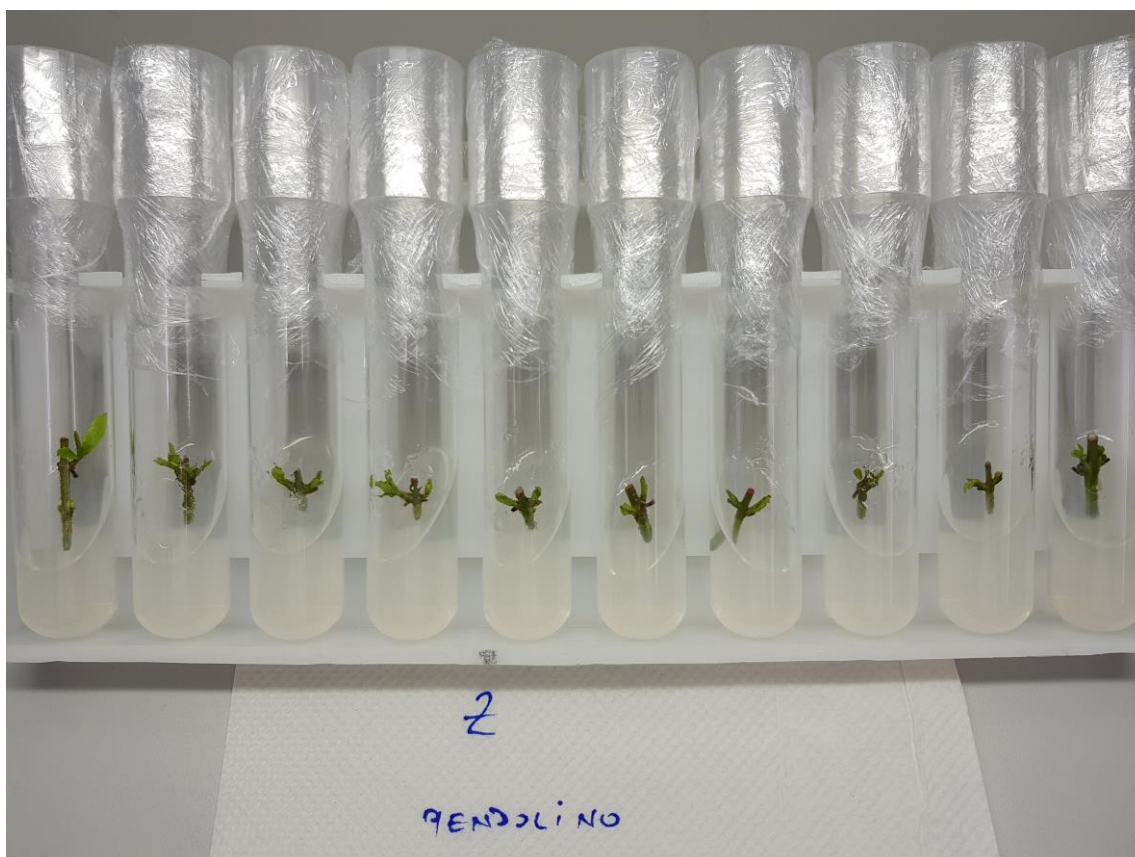


Slika 24. Proliferacija kultivara Leccino na tretmanu T3 – tidiazuron
(Foto: Bošnjak, 2019.)

Proliferacija kultivara Pendolino također je vrlo uspješna sa 100 % pri tretmanu s tidiazuronom (T3 – TDZ) i zeatinom (T1 – Z, Slika 25.) te 70 % na kokosovoj vodi (T2 – COCO). Također kontaminacija eksplantata (uspješnost sterilizacije) je izostala te je samo 30 % eksplantata na tretmanu kokosovom vodom (T2 – COCO) odumrlo (Grafikon 2.).

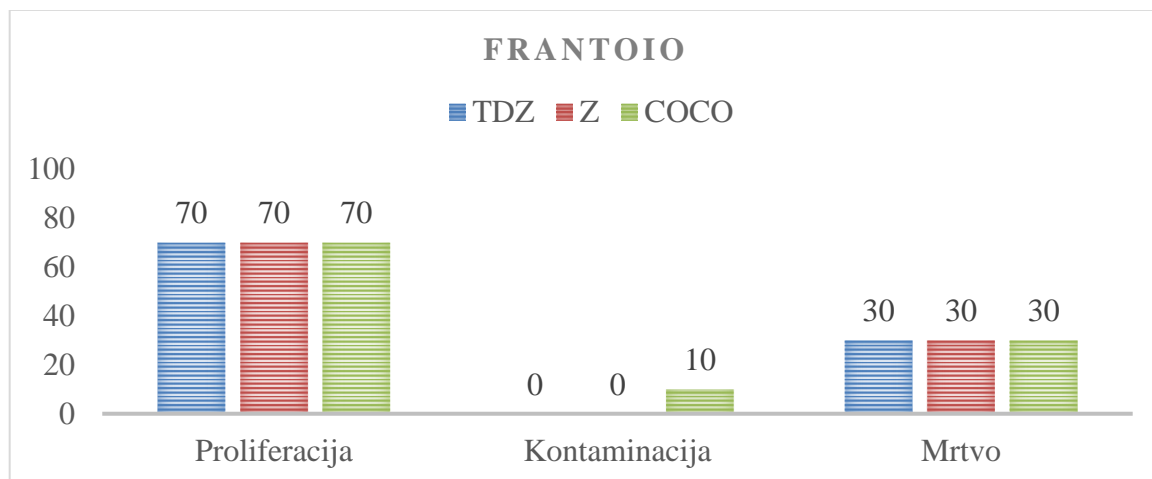


Grafikon 2. Uspješnost proliferacije i sterilizacije na kultivaru Pendolino



Slika 25. Proliferacija kultivara Pendolino na tretmanu T1 – zeatin
(Foto: Bošnjak, 2019.)

Uspješnost proliferacije na kultivari Frantoio je nešto manja u odnos na prethodna dva kultivara. Proliferacija pri svim tretmanima kretala se u vrijednosti od 70 %. Samo je tretman s kokosovom vodom (T2 – COCO, Slika 26.) inicirao kontaminaciju na 10 % eksplantata. Stupanj odumrlih eksplantata je podjednak na svim tretmanima, a iznosi 30 % (Grafikon 3.).



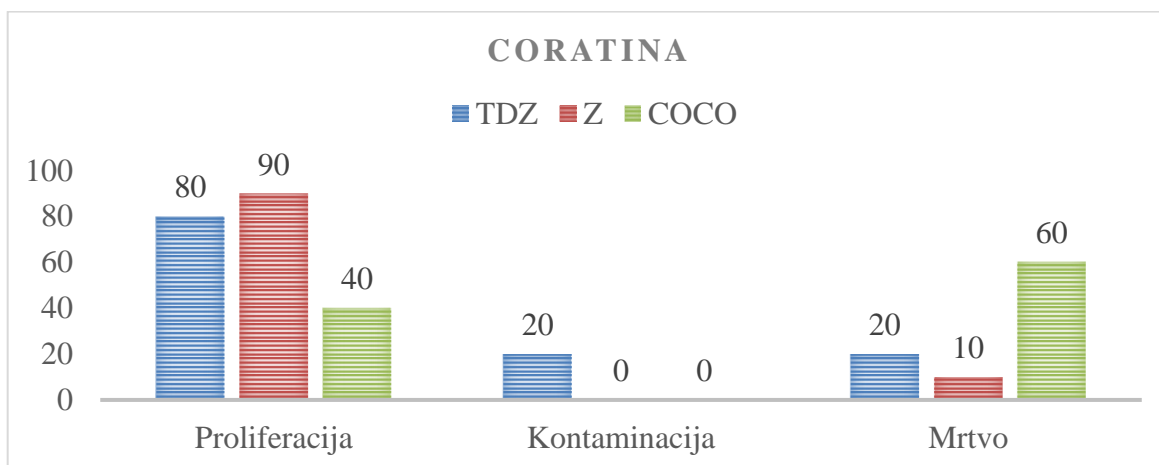
Grafikon 3. Uspješnost proliferacije i sterilizacije na kultivaru Frantoio



Slika 26. Proliferacija kultivara Frantoio na tretmanu T2 – kokosova voda

(Foto: Bošnjak, 2019.)

Proliferacija na kultivaru Coratina (Grafikon 4.) kretala se u rasponu uspješnosti od 40 % (T2 – COCO) na kokosovoj vodi, preko 80 % (T3 – TDZ) na tidiazuronu do čak 90 % (T1 – Z, Slika 27.) na zeatinu. Uspješnost sterilizacije od 0 % kontaminacije zabilježena je pr tretmanima s zeatinom (T1 – Z) i kokosovom vodom (T2 – COCO) dok je na 20 % eksplantata pri tretmanu tidiazuronom (T3 – TDZ) zabilježeno svega 20 % kontaminacije. Odumiranje eksplantata kretalo se u rasponu od 10 % pri zeatinu (T2 - Z), 20 % tidiazuronu (T3 – TDZ) i vrlo velikom od 60 % na tretmanu s kokosovom vodom (T2 – COCO).



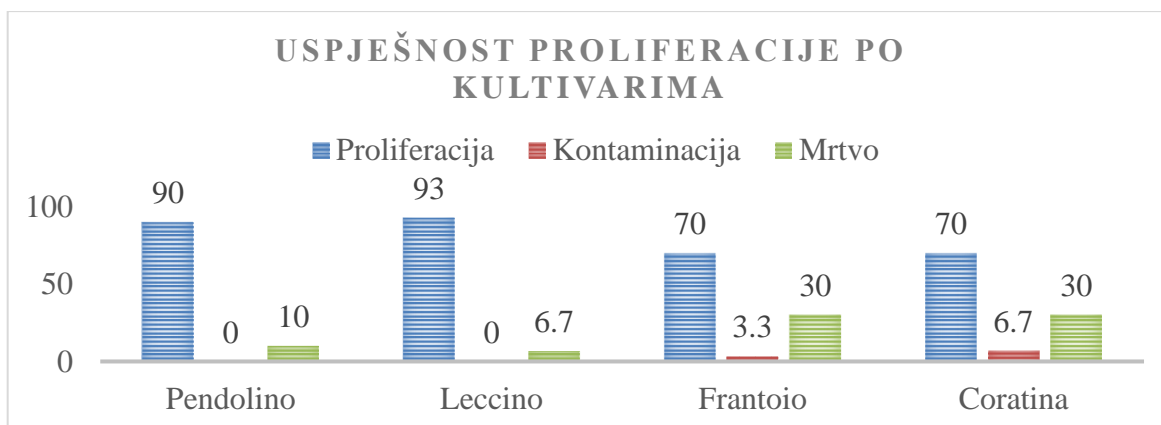
Grafikon 4. Uspješnost proliferacije i sterilizacije na kultivaru Coratina



Slika 27. Proliferacija kultivara Coratina na tretmanu T1 – zeatin

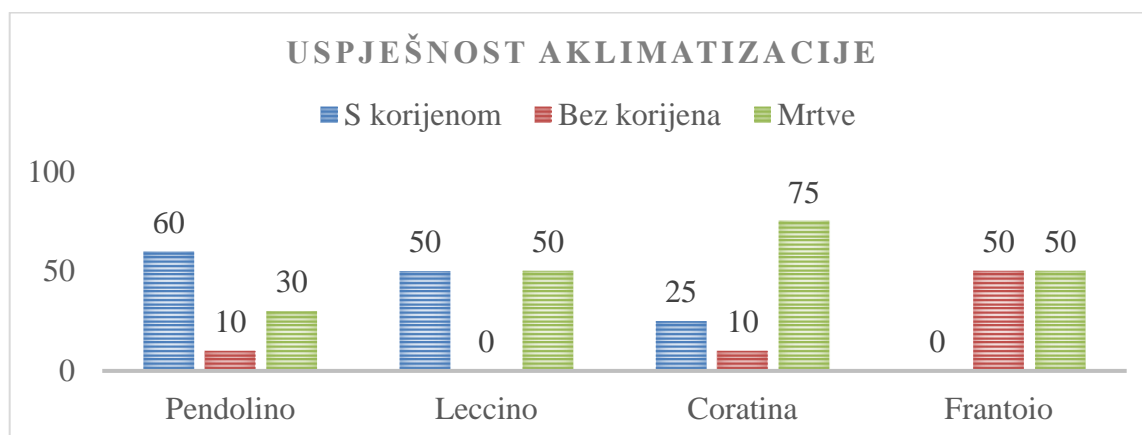
(Foto: Bošnjak, 2019.)

Uzimajući u obzir sve tretmane uspješnost proliferacije i sterilizacije kreće se u rasponu od 70 % za kultivare Frantoio i Coratina, 90 % Pendolino i 93 % Leccino. Kontaminacija je izostala na kultivarima Pendolino i Leccino, dok je vrlo mala kontaminacija eksplantata zabilježena pri kultivaru Frantoio od 3.3 % te kultivaru Coratina od 6.7 %. Odumiranje eksplantata kretalo se u rasponu od 6.7 % na kultivaru Leccino, 10 % Pendolino i po 30 % Frantoio i Coratina (Grafikon 5.).



Grafikon 5. Uspješnost proliferacije i sterilizacije za sve kultivare

Prema grafikonu 6. nakon 40 dana faze aklimatizacije kultivar Pendolino (Slika 28.) rezultirao je s najvećom stopom aklimatizacije od 60 % ukorijenjenih izdanaka, svega 10 % nije razvilo korijen, a odumrlo je 30 % izdanaka. Leccino je razvio korijenje na 50 % izdanaka, dok je 50 % izdanaka odumrlo. Coratina je inicirala svega 25 % ukorijenjenih, 10 % bez korijena i s čak 75 % odumrlih izdanaka. Najlošiji rezultati zabilježeni su kod kultivara Frantoio kod kojeg aklimatizacija nije uspješno završila, odnosno 50 % izdanaka nije iniciralo korijen, a 50 % je odumrlo.

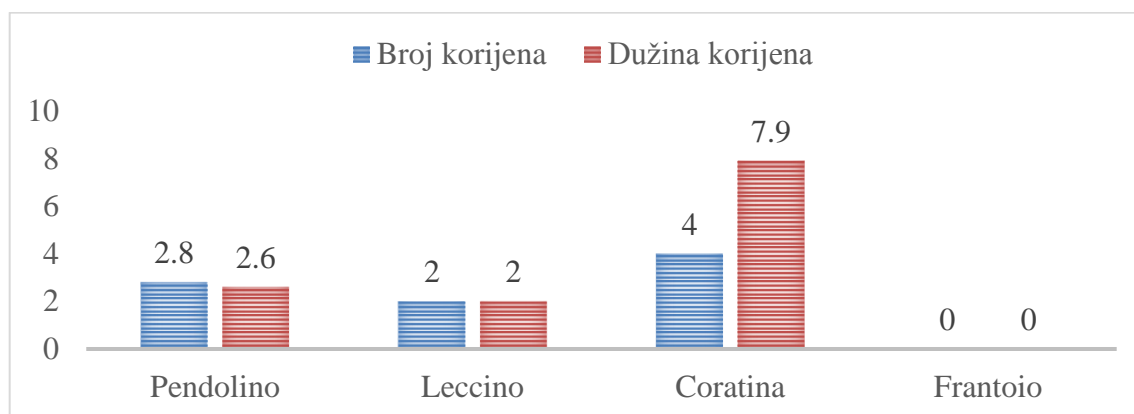


Grafikon 6. Uspješnost aklimatizacije nakon 40 dana



Slika 28. Uspješnost aklimatizacije i rizogeneza kultivara Pendolino
(Foto: Bošnjak, 2019.)

Najveći broj i dužinu korijena razvio je kultivar Coratina, zatim Pendolino i Leccino (Slika 29.). Kultivar Frantoio nije inicirao korijen niti na jednom izdanku (Grafikon 7.).



Grafikon 7. Usporedba morfološki parametri korijena po kultivarima



Slika 29. Rizogeneza po kultivarima (Foto: Bošnjak, 2019.)

6. ZAKLJUČAK

Za većinu sorti masline mikropropagacija predstavlja vrlo brz i masivan način razmnožavanja. Jedan od glavnih uvjeta uspješne mikropropagacije je svakako hranjivi mediji. U našem istraživanju korišten je OM mediji (*Rugini olive medium*) koji se pokazao kao vrlo povoljan u mikropropagaciji masline. Također i sterilizacija je dosta uspješno provedena s predtretmanima u cilju smanjenja fenolne oksidacije (citrična i askorbinska kiselina, PVP) i kontaminacije (kombinacije fungicida i antibiotika, PPM). Vrlo važni hormoni u *in vitro* proizvodnji masline su citokinini i auksini. Svi korišteni hormoni u istraživanju uspješno su inicirali proliferaciju ali i rizogenezu. Također vrlo bitan čimbenik uspješnosti je i izvor energije (šećer) u našem slučaju manitol koji je korišten u svim fazama mikropropagacije. Osim pravilnog odabira medija, hormona i izvora energije o uspješnost mikropropagacije ovisi i izbor eksplantata, njegovoj starosti, načinu uzorkovanja, vremenu uzorkovanja i uvjetima pod kojim je rastao te uvjetima u finalnoj fazi aklimatizacije.

- Uspješnost proliferacije i sterilizacije kreće se u rasponu od 70 % za kultivare Frantoio i Coratina, 90 % Pendolino i 93 % Leccino.
- Najbolji rezultati proliferacije dobiveni su pri upotrebi hormona zeatina (T1) i tidiazurona (T3).
- Kontaminacija je izostala na kultivarima Pendolino i Leccino, dok je vrlo mala kontaminacija eksplantata zabilježena pri kultivaru Frantoio od 3.3 % te kultivaru Coratina od 6.7 %.
- Odumiranje eksplantata kretalo se u rasponu od 6.7 % na kultivaru Leccino, 10 % Pendolino i po 30 % Frantoio i Coratina
- Utvrđena je velika sortna varijabilnost u odgovoru na primijenjene tretmane.
- Rezultati na razini cijelog pokusa ukazuju na slabiji odgovor kultivara Leccino u odnosu na ostale kultivare po pitanju promatranih parametara veličina izdanaka, broj izdanaka i listova te multiplikacija. Pretpostavka je kako je ovaj kultivar vrlo težak za mikropropagaciju te se daljnja istraživanja trebaju usmjeriti u cilju ispitivanja drugih koncentracija komponenata medija i/ili hormona.
- Kultivari Pendolino, Frantoio i Coratina inducirali su podjednake veličine izdanaka te među njima nema značajne razlike.

- Pendolino je jedini inicirao znatno veći broj izdanaka u odnosu na ostale kultivare, dok je broj listova i multiplikacija značajno veća u odnosu na kultivar Leccino i Coratina.
- Eksplantati koji su bili pod utjecajem tretman s zeatinom (T1) u odnosu na ostale tretmane bez obzira na kultivar razvili su značajno veće izdanke, veći broj listova i multiplikaciju.
- Tretman T2 – kokosova voda razvio je značajno veći broj izdanaka u odnosu na tretman s tidiazuronom (T3).
- Nije utvrđena značajna razlika između tretmana kokosova voda (T2) i tidiazurona (T3) po pitanju ostalih promatranih parametara veličina izdanaka, broj listova i multiplikacija.
- Nakon 40 dana faze aklimatizacije kultivar Pendolino rezultirao je s najvećom stopom aklimatizacije od 60 % ukorijenjenih izdanaka, zatim Leccino s 50 %, Coratina 25 %, a najlošiji rezultati zabilježeni su kod kultivara Frantoio kod kojeg niti jedan izdanak nije inicirao korijen.
- Najveću dužinu i broj korjenčića razvio je kultivar Coratina, zatim Pendolino i Leccino.

Daljnja istraživanja usmjeriti na ispitivanje mogućnosti uporabe suvremenih imerznih bioreaktora u mikropropagaciji ova 4 kultivara masline. Također potrebno je ispitati druge koncentracije zeatina ili kombinaciju pojedinih hormona na kultivaru Leccino. Poznato je da maslina u mikropropagaciji vrlo teško razvija više izdanaka na eksplantatu. Tretman kokosovom vodom (T2) uz zeatin (T1) inicirao je više izdanaka po eksplantatu što ukazuje na potencijal njegove upotrebe u kulturi tkiva masline. Rezultati gore navedenog istraživanja pokazuju pozitivan učinak kokosove vode kao izvora citokinina i nameću potrebu daljeg istraživanja u cilju određivanja optimalne koncentracije ili kombinacije.

7. POPIS LITERATURE

- Abousalim A., Brhadda N. and Loudiyi D., 2004. Essais de prolifération et d'enracinement de matériel issu de rajeunissement par bouturage d'oliviers adultes (*Olea europaea* L.) et de germination in vitro : effets de cytokinine et d'auxines. *Biotechnology. Agronomical Society*, 2004 (9), pp. 237-240.
- Arinaitwe G., Rubaihayo P.R. and Magambo M.J.S. 2000. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. *Sci. Hortic.* 86: 13–21.
- Barranco D., Fernández D. and Rallo L., 1992. *La Culture de l'olivier*. Editions Mundi
- Bottari, V., e Spina, P. (1952): „le varietà di olive coltivate in Sicilia, Roma“
- Bieliski R.L., 1982. Sugar alcohols. *Encyclopedia of plant physiology*, new series ed. Loewus and Tanner, voll3A: 158-192.
- Cevie asbl, 1997. *Les Multiples Applications de la Culture in vitro des Végétaux Supérieurs*, 8ème édition, 154 pp.
- Cozza R., Turco D., Briccoli Bati C. and Bitonti M.B. 1997. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 51: 215–223.
- Denninger C., Garnaud V. and Laverne J.P., 1993. *Savoir tout faire au jardin*. Ed. Readers Digest, 658pp.
- Diamantoglou S. and Mitrakos K., 1981. Leaf longevity in Mediterranean evergreen
- Fabbri A., Bartolini G, Lambardi M, Kailis S (2004) *Olive propagation manual*. CSIRO, Melbourne
- Fabbri A, Lambardi M, Ozden-Tokatli Y (2009) Olive breeding. In: Jain SM, Priyadarshan PM (eds) *Breeding plantation tree crops: tropical species*. Springer, New York
- Fahn A., 1986. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. *Ann. Bot.* pp. 631-638.

- Giono P., Sorrentino G. and d' Andria R., 1999. Stomatal behaviour, leaf water status and photosynthetic response in field-grown olive trees under water deficit. *Environm. Exper. Bot*, 42:pp. 95-104.
- Gucci R., Lombardini L. and Tattini M., 1997. Analysis of leaf water relations in leaves of two olives (*olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree Physiology*, 17, pp. 13-21.
- Grigoriadou K, Vasilakakis M, Eleftherios EP (2002) In vitro propagation of the Greek olive cultivar Chondrolia Chalkidikis. *Plant Cell Tissue Org Cult* 71:47–54
- Jacoboni, N. (1989) Propagation. *Olioiva* 25.
- Karam N.S. and Al-Majathoub M. 2000. In vitro regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. *Sci. Hortic* 86: 323–333.
- Loukas M, Krimbas CB (1983) History of olive cultivars based on their genetic distances. *J Hort Sci* 58:121–127
- Miranović Ksenija (2006)- *Maslina (Olea europaea L.)*, Podgorica
- Martin G.C., 1996. *Olea europaea L.*
- Mladar, N., Strikić, F., Rošin, J. (2000) Obnova starih maslinika. Zbornik sažetaka Znanstvenog skupa «Unapređenje poljoprivrede i šumarstva na kršu» Split.
- Moreno F., Fernandez J.E., Clothier B.E. and Green S.R., 1996. Transpiration and root water uptake by olive trees. *Plant and Soil*, 184, pp. 85-96.
- Murthy B.N.S., Murch S.J. and Saxena P.K. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34: 267–275.
- Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture: *Physiology Plant* 15, pp. 473-497.
- Mencuccini M., Micheli M. and Standardi A., 1995. Micropropagazione dell'olivo : effetto di citochinine sulla proliferazione. *Italica Hortus*, 4, pp. 33-37.

- Peixe, A., Raposo A., Lourenço R., Cardoso H. and Macedo E., 2007. Coconut water and BAP successfully replaced Zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation, pp. 1-7.
- Rugini E. 1995. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Jain S., Gupta P. and Newton R. (eds), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 171–189.
- Rugini E. 1984. In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L) cultivars with different root-ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Sci. Hortic.* 24: 123–134.
- Rugini E., Pezza A., Muganu M. and Carizato G. 1995. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L). In: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 30 Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*. Springer Verlag, Berlin, pp. 404–414.
- Rugini E., Fedeli E., 1990. Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 10, Ed. by P.S. Bajaj, pp 593-641.
- Rugini E. 1986. Olive (*Olea europaea* L.) in *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 1 Trees I (Ed. By Y.P.S. Bajaj) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.253-267
- Rugini E (1990) In vitro culture of olive: an overview of the present scientific status. *Acta Hortic* 286:93–96
- Rugini E, Baldoni L (2004) *Olea europea* Olive. In: Litz RE (ed) *Biotechnology of Fruit and Nut crops*. Chap 15 CABI Publishing, Noworty Way, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE, UK, pp 404–428
- Rokba Z.A., Loxou V.K. and Lionakis S.M., 2000. Regeneration of olive (*Olea europaea* L.,) in vitro. Cost.843, WG1: Development biology or regeneration.1st meeting, 12- 15 Oct, Geisenheim: pp. 25-26.
- Sakunasingh P., Thepsithar C. and Thongpukdee A., 2004. In vitro shoot culture of olive (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina. Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand.
- Technivit@wanadoo.fr, 2007. Les cultures in vitro et les techniques appliquées

Zohary A, Spiegel-Roy P (1975) Beginning of fruit growing in the Old World. Science 187:319–327

Zohary D, Hopf M (1994) Domestication of plants in the Old World, 2nd edn. Clarendon, Oxford

Zuccherelli G. and Zuccherelli S., 2003. In vitro propagation of fifty olive cultivars. ISHS Acta Horticulturae 586: IV International Symposium on Olive Growing.

Internet izvor:

1. <https://www.np-brijuni.hr/hr/istrazi-brijune/mjesta-koja-morate-posjetiti/maslina-na-brijunima>
2. <https://www.growingbonsai.net/olive-pre-bonsai-repotting/>
3. <https://forum.krstarica.com/threads/dobro-drvo.695709/page-2>
4. <https://www.prelog.hr/akcija-maslinova-grancica/a3395>
5. <http://www.zupskiportal.hr/novost/2653/List-masline-pravi-zimski-eliksir>
6. <http://www.maslinar.eu/hr/savjeti/Pocinje-cvatnja-maslina/7/1238/Item.aspx>
7. <https://www.coolinarika.com/clanak/maslina-hrana-i-lijek/>
8. <https://www.parentium.com/prva.asp?clanak=46933>
9. <https://www.tapataalk.com/groups/vrtlari/maslina-olea-europaea-t759.html>
10. <http://www.schundler.com/effective.htm>
11. <http://www.pp-vransko-jezero.hr/hr/radionica-za-maslinare-cijepljenje-maslina/>
12. <http://www.maslinovoulje-hr.com/o-maslinama>
13. <http://masline-u-istri.blogspot.com/>
14. <https://www.agroportal.hr/agro-baza/sortne-liste/masline-sortne-liste/8106>
15. <https://www.agroportal.hr/agro-baza/sortne-liste/masline-sortne-liste/8094>

8. SAŽETAK

Maslina je jedna od najvažnijih voćnih vrsta na području Mediterana. Posljednjih godina zabilježen je trend povećanja površina pod intenzivnim nasadima masline u cijelom svijetu. Za većinu sorti masline mikropropagacija predstavlja vrlo brz i masivan način razmnožavanja. Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva u sklopu Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, laboratorij za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost uvođenja 4 kultivara masline (Leccino, Pendolino, Frantoio i Coratina) u kulturu tkiva modifikacijom hranjive podloge određenim vrstama citokinina i ispitati mogućnost aklimatizacije masline transferom eksplantata na supstrat (*ex vitro*). Korištena su tri tretmana citokinina (T1 - zeatin; T2 - kokosova voda + BAP 6 i T3 - tidiazuron + BAP) u indukciji izdanaka te jedan tretman s IBA u fazi rizogeneze *ex vitro*. Uspješnost proliferacije i sterilizacije kreće se u rasponu od 70 % do 93 %. Najbolji rezultati proliferacije dobiveni su pri upotrebi hormona zeatina i tidiazurona. Utvrđena je velika sortna varijabilnost u odgovoru na primijenjene tretmane. Eksplantati koji su bili pod utjecajem tretman s zeatinom (T1) u odnosu na ostale tretmane bez obzira na kultivar razvili su značajno veće izdanke, veći broj listova i multiplikaciju. Nakon 40 dana aklimatizacija se kretala od 25 do 60 %. Rezultati gore navedenog istraživanja pokazuju pozitivan učinak zeatina ali i kokosove vode kao izvora citokinina i nameću potrebu daljeg istraživanja u cilju određivanja optimalne koncentracije i/ili kombinacije.

Ključne riječi: maslina, mikropropagacija, aklimatizacija, zeatin, kokosova voda.

9. SUMMARY

Olive is one of the most important fruit species in the Mediterranean area. In recent years trend was recorded of increasing areas under intensive olive orchards worldwide. For most olive varieties micropropagation is a very fast and massive way of propagation. Research was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory in Department of Pomology, Viticulture and Enology, Fruit Laboratory at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek. The aim of this study was to investigate possibility of introducing 4 olive cultivars (Leccino, Pendolino, Frantoio and Coratina) into tissue culture by modifying nutrient medium with certain types of cytokinins and to examine possibility of acclimatization by transfer explants to the substrate (*ex vitro*). Three cytokinin treatments (T1 - zeatin; T2 - coconut water + BAP 6 and T3 - thidiazuron + BAP) were used to induce shoots initiation and elongation and one treatment with IBA at rhizogenesis phase *ex vitro*. The success of proliferation and sterilization was 70% to 93%. The best proliferation results was obtained with use of hormones zeatin and thidiazuron. High varietal variability was found in response to the treatments applied. Explants under influenced by zeatin (T1) treatment compared to other treatments developed significantly larger shoots, higher leaf numbers, and multiplication. After 40 days acclimatization success was 25 to 60%. The results of this study show the positive effect of zeatin and coconut water as a source of cytokinins and impose need for further research to determine the optimal concentration and/or combination.

Key words: olive, micropropagation, acclimatization, zeatin, coconut water

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Proizvodnja maslina.....	13
Tablica 2. Sastav OM hranjive podloge korištene u istraživanju.....	28
Tablica 3. Korišteni tretmani u istraživanju.....	29
Tablica 4. Statističke razlike na razini pokusa unutar kultivara i tretmana te interakcija kultivar x tretman za parametre veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija.....	32
Tablica 5. Razlike između kultivara (Leccino, Pendolino, Frantoio, Coratina) unutar tretmana zeatinom (T1) na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	33
Tablica 6. Razlike između kultivara (Leccino, Pendolino, Frantoio, Coratina) unutar tretmana kokosovom vodom (T2) na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	34
Tablica 7. Razlike između kultivara (Leccino, Pendolino, Frantoio, Coratina) unutar tretmana tidiazuronom (T3) na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	34
Tablica 8. Razlike između tretmana (Zeatin, Kokosova voda, Tidiazuron) za kultivar Leccino na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	35
Tablica 9. Razlike između tretmana (Zeatin, Kokosova voda, Tidiazuron) za kultivar Pendolino na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	35
Tablica 10. Razlike između tretmana (Zeatin, Kokosova voda, Tidiazuron) za kultivar Frantoio na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	36
Tablica 11. Razlike između tretmana citokininom (Zeatin, Kokosova voda, Tidiazuron) za kultivar Coratina na promatrane parametre (veličina izdanaka, broj izdanaka, broj listova i multiplikacija).....	37

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Brijunska maslina.....	3
Slika 2. Korijen masline.....	5
Slika 3. Deblo masline.....	5
Slika 4. Grančica masline.....	6
Slika 5. List masline.....	7
Slika 6. Cvijet masline.....	8
Slika 7. Plod masline.....	9
Slika 8. Štete od vjetra.....	12
Slika 9. Guke masline.....	16
Slika 10. Razmnožavanje maslina reznicama.....	17
Slika 11. Cijepljenje maslina.....	17
Slika 12. In vitro maslina pred fazu druge multiplikacije.....	22
Slika 13. Klima komora s biljnim materijalom u raznim fazama mikropropagacije-labaratoriji za voćarstvo.....	23
Slika 14. Plod masline Leccino.....	24
Slika 15. Plod masline Pendolino.....	25
Slika 16. Plodovi masline Frantoio.....	25
Slika 17. Plodovi masline Coratina.....	26
Slika 18. Kultivari u istraživanju-etikete (certifikati) na matičnim biljkama.....	26
Slika 19. Inicijacija i uvođenje eksplantata masline na hranjivi mediji za proliferaciju.....	27
Slika 20. Punjenje epruveta OM medijem.....	30
Slika 21. Kokosova voda.....	30

Slika 22. Pendolino – tretman Zeatin T1.....	36
Slika 23. Coratina – tretman Zeatin T1.....	37
Slika 24. Proliferacija kultivara Leccino na tretmanu T3.....	38
Slika 25. Proliferacija kultivara Pendolino na tretmanu T1- zeatin.....	39
Slika 26. Proliferacija kultivara Frantoio na tretmanu T2 – kokosova voda.....	40
Slika 27. Proliferacija kultivara Coratina na tretmanu T1- zeatin.....	41
Slika 28. Uspješnost aklimatizacije i rizogenze kultivara Pendolino.....	43
Slika 29. Rizogeneza po kultivarima.....	43

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Uspješnost proliferacije i sterilizacije na kultivaru Leccino.....	38
Grafikon 2. Uspješnost proliferacije i sterilizacije na kultivaru Pendolino.....	39
Grafikon 3. Uspješnost proliferacije i sterilizacije na kultivaru Frantoio.....	40
Grafikon 4. Uspješnost proliferacije i sterilizacije na kultivaru Coratina.....	41
Grafikon 5. Uspješnost proliferacije i sterilizacije za sve kultivare.....	42
Grafikon 6. Uspješnost aklimatizacije nakon 40 dana.....	42
Grafikon 7. Usporedba morfološki parametri korijena po kultivarima.....	43

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij, smjer Voćarstvo

Diplomski rad

MIKROPROPAGACIJA I AKLIMATIZACIJA MASLINE (*Olea europaea* L.)

Mario Stanić

Sažetak: Maslina je jedna od najvažnijih voćnih vrsta na području Mediterana. Posljednjih godina zabilježen je trend povećanja površina pod intenzivnim nasadima masline u cijelom svijetu. Za većinu sorti masline mikropropagacija predstavlja vrlo brz i masivan način razmnožavanja. Istraživanje je provedeno u laboratoriju za kulturu biljnog tkiva u sklopu Katedre za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, laboratorij za voćarstvo na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost uvođenja 4 kultivara masline (Leccino, Pendolino, Frantoio i Coratina) u kulturu tkiva modifikacijom hranjive podloge određenim vrstama citokinina i ispitati mogućnost aklimatizacije masline transferom eksplantata na supstrat (*ex vitro*). Korištena su tri tretmana citokinina (T1 - zeatin; T2 - kokosova voda + BAP 6 i T3 - tidiazuron + BAP) u indukciji izdanaka te jedan tretman s IBA u fazi rizogeneze *ex vitro*. Uspješnost proliferacije i sterilizacije kreće se u rasponu od 70 % do 93 %. Najbolji rezultati proliferacije dobiveni su pri upotrebi hormona zeatina i tidiazurona. Utvrđena je velika sortna varijabilnost u odgovoru na primijenjene tretmane. Eksplantati koji su bili pod utjecajem tretman s zeatinom (T1) u odnosu na ostale tretmane bez obzira na kultivar razvili su značajno veće izdanke, veći broj listova i multiplikaciju. Nakon 40 dana aklimatizacija se kretala od 25 do 60 %. Rezultati gore navedenog istraživanja pokazuju pozitivan učinak zeatina ali i kokosove vode kao izvora citokinina i nameću potrebu daljeg istraživanja u cilju određivanja optimalne koncentracije ili kombinacije.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijeku

Mentor: prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević

Broj stranica: 58

Broj grafikona i slika: 36

Broj tablica: 11

Broj literaturnih navoda: 39

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: maslina, mikropropagacija, aklimatizacija, zeatin, kokosova voda

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv.prof.dr.sc. Brigita Popović, predsjednik
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, mentor
3. doc.dr.sc. Dejan Agić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University graduate study, course Pomology

Graduate work

MICROPROPAGATION AND ACCLIMATIZATION OF OLIVE (*Olea europaea* L.)

Mario Stanić

Abstract: Olive is one of the most important fruit species in the Mediterranean area. In recent years' trend was recorded of increasing areas under intensive olive orchards worldwide. For most olive varieties micropropagation is a very fast and massive way of propagation. Research was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory in Department of Pomology, Viticulture and Enology, Fruit Laboratory at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek. The aim of this study was to investigate possibility of introducing 4 olive cultivars (Leccino, Pendolino, Frantoio and Coratina) into tissue culture by modifying nutrient medium with certain types of cytokinins and to examine possibility of acclimatization by transfer explants to the substrate (*ex vitro*). Three cytokinin treatments (T1 - zeatin; T2 - coconut water + BAP 6 and T3 - thidiazuron + BAP) were used to induce shoots initiation and elongation and one treatment with IBA at rhizogenesis phase *ex vitro*. The success of proliferation and sterilization was 70% to 93%. The best proliferation results were obtained with use of hormones zeatin and thidiazuron. High varietal variability was found in response to the treatments applied. Explants under influenced by zeatin (T1) treatment compared to other treatments developed significantly larger shoots, higher leaf numbers, and multiplication. After 40 days' acclimatization success was 25 to 60%. The results of this study show the positive effect of zeatin and coconut water as a source of cytokinins and impose need for further research to determine the optimal concentration and/or combination.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević

Number of pages: 57

Number of figures and pictures: 36

Number of tables: 11

Number of references: 39

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: olive, micropropagation, acclimatization, zeatin, coconut water

Reviewers:

1. Brigita Popović, Ph.D., assoc. prof., president
2. Aleksandar Stanisavljević, Ph.D. full. prof., mentor
3. Dejan Agić, asst. prof., member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.